Sortenspezifische Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit bei Apfel während der Lagerung unter Berücksichtigung des Signalmoleküls Ethylen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften (Dr. sc. agr.)

Fakultät Agrarwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Kulturpflanzenwissenschaften Fachgebiet Ertragsphysiologie der Sonderkulturen

vorgelegt von Telse Zimmermann

aus Hamburg

Mündliche Prüfung: 15.11.2019

Dekan: Prof. Dr. Ralf T. Vögele

Kolloqiumsleiter: Prof. Dr. Thilo Streck

- 1. Berichtende Person: Prof. Dr. Jens N. Wünsche
- 2. Berichtende Person: Prof. Dr. (em.) Georg Noga
- 3. Prüfende Person: Prof. Dr. Folkard Asch

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jens Wünsche bedanken, der mir diese Promotion ermöglicht hat. Seine Tür stand aus jeder Entfernung für Rat, Meinung und Diskussion offen. Ganz besonders möchte ich ihm aber zum einen dafür danken, dass er mir die Freiheit und Zeit ließ Ideen auszuprobieren, auch wenn diese nicht zum gewünschten Erfolg führten, und zum anderen, dass er mir einen mehrwöchigen Auslandsaufenthalt in Montpellier, Frankeich, ermöglichte, während dessen ich viele wichtige Erfahrungen sowohl beruflicher als auch privater Natur machte.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. (em.) Georg Noga und Herrn Prof. Dr. (em.) Gerd Weber, die die weitere Prüfung dieser Thesis übernehmen.

Als nächstes möchte ich mich bei Herrn Dr. Manfred Büchele, dem Geschäftsführer des Kompetenzentrums Obstbau Bodensee (KOB), bedanken, durch dessen Kooperation die praktische Durchführung zu dieser Promotion ermöglicht wurde. Weiterhin gilt ein sehr großes Dankeschön der Arbeitsgruppe Ernte, Lagerung und Fruchtqualität am KOB, dessen damaliger Fachbereichsleiter, Dr. Dominikus Kittemann, mich tatkräftig bei der Planung und Durchführung der Promotionsarbeit begleitet und unterstützt hat, sowie seinem Nachfolger, Dr. Daniel Neuwald, der meine Betreuung anschließend übernommen hat. Ein herzlicher Dank gilt den Laborangestellten dieser Arbeitsgruppe, die durch gute Laune und Tatkraft die gemeinsame Arbeit im Labor vereinfacht haben. Insbesondere möchte ich mich bei Berenice Vollmer bedanken, welche die Tage der Probennahmen bereits morgens um 6:00 mit mir im Labor begonnen hatte.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans Konrad Biesalski und apl. Prof. Dr. Donatus Nohr des Fachgebiet Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim, die mir freundlicherweise die Benutzung ihres Labors und Geräte erlaubt haben. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Piepho und seinem Mitarbeitern Karin Hartung, Carlos Laso Bayas, Angela Bernal Vasquez und Filippo Capezzone des Fachgebiets Biostatistik der Universität Hohenheim für ihre Beratung in der statistischen Umsetzung und Auswertung der Versuchsergebnisse bedanken.

Bei allen Kollegen des Fachgebiets für Ertragsphysiologie der Sonderkulturen möchte ich mich außerordentlich herzlich für den freundlichen und hilfsbereiten Umgang bedanken, wobei ich besonders Ute Born für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor sowie bei PD Dr. Patrick Winterhagen und Dr. Michael Hagemann für die vielen Diskussionen danken, die zur Klarstellung meiner Gedanken beitrugen und häufig während der Mittagspause stattfanden. Ein gesonderter Dank gilt B. Sc. Thyra v. Bornstaedt für ihre Mithilfe an dieser Promotion durch ihre Abschlussarbeit.

In die Ferne möchte ich ein großes Dankeschön an Jean Luc Verdeil und seinem Team am Plate-forme d'Histocytologie et d'Imagerie Cellulaire végétale (PHIV) in Montpellier, Frankreich, schicken, die mich in die Arbeiten zur Histologie eingewiesen und betreut haben sowie an Dr. Jamil Harb und Omar Saleh von der Birzeit Universität in Palästina für ihre Unterstützung der molekulargenetischen Untersuchungen.

Ein übermäßiger Dank gilt meiner Kommilitonin und Freundin Frau Dr. Tabea Hornung (geb. Frey), die mich die methodischen Aspekte der Wissenschaft gelehrt hat zu beachten und mir in vielen Diskussionen mit Rat und Tat zur Seit stand. Meinen Freunden Dr. Julia Fütterer (geb. Wimmer), Benjamin Pförtner, Corina Neuwald, Marc Sellwig (geb. Spuhler), Björn Schmidt und Tea Kleijic, die ich am KOB kennen- und lieben gelernt habe. Ihnen schulde ich ebenfalls einen immensen Dank, da sie mir mal mehr mental, mal mehr physisch zur Seite standen während meiner praktischen Versuchszeit und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonders liebevoller Dank gilt meinem Lebensgefährten und Vater meiner Kinder Patrick Nitka, meiner Mutter und ihrem Lebensgefährten sowie meinem Vater und seiner Frau für die allzeit mentale Unterstützung insbesondere in den schweren Zeiten der Promotionsarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	xii
Abkürzungsverzeichnis	.xiv
1. Einleitung	1
1.1 Reife	1
1.2 Ethylen	4
1.2.1 Ethylenbiosynthese	4
1.2.2 Ethylensignaltransduktion	5
1.3 Zellwand	8
1.3.1 Aufbau und Zusammensetzung der Zellwand	9
1.3.2 Veränderung der Zellwand während der Fruchtreife	. 12
2. Ziel dieser Arbeit	. 16
3. Material und Methoden	. 18
3.1 Versuchsstandort und Pflanzmaterial	. 18
3.2 Versuchsaufbau	. 18
3.3. Fruchtfleischfestigkeit	. 21
3.4 Ethylenbiosynthese	. 22
3.5. Histologie	. 25
3.6. Aktivität zellwandmodifizierender Enzyme	. 27
3.7. Genexpression	. 31
3.8. Statistik	. 33
4. Ergebnis	. 34
4.1. Fruchtfleischfestigkeit	. 34
4.1.1 Versuchsjahr 2012/13	. 34
4.1.2 Versuchsjahr 2013/14	. 36
4.2 Ethylenbiosynthese	. 37
4.2.1 Versuchsjahr 2012/13	. 37
4.2.2 Versuchsjahr 2013/14	. 41
4.3 Genexpression der Ethylenbiosynthese-Enzyme und Ethylensignaltransduktionsprote	eine
	. 44
4.3.1 Ethylenbiosynthese-Enzyme	. 44
4.3.2 Ethylensignaltransduktionsproteine	. 45
4.4. Histologie	. 49
4.5 Aktivität zellwandmodifizierender Enzyme	. 50
4.5.1 PME-Aktivität	. 50
4.5.2 GAL-Aktivität	. 51
4.6 Genexpression der zellwandmodifizierenden Proteine	. 53
4.6.1 Pektinmodifizierende Enzyme	. 53
4.6.2 Hemizellulose- und zellulosemodifizierende Proteine	. 56
5. Diskussion	. 59
5.1 Fruchtfleischfestigkeit	. 59
5.2 Ethylenbiosynthese im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit	. 60
5.3 Ethylensignaltransduktion im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit	. 66
5.4 Zellwandmodifizierende Proteine im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit	. 71
5.5 Histologie im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit	. 78
6. Fazit	. 80
7. Ausblick	. 83
8. Zusammenfassung	. 85
9. Summary	87
	. 07
Quellen	. 88

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Entstehung der Ethylenantwort nach Shakeel *et al.* (2013) und Ju & Chang (2015). Sobald Ethylen (C₂H₄) an den Ethylenrezeptor bindet, dessen Bindungsstelle sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet, wird die Proteinkinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) aktiviert und löst eine Signalkaskade aus, die im Zellkern die Expression der ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)-Gene startet. Deren Produkt, die ERF-Transkriptionsfaktoren, lösen die Expression der diversen Gene der Ethylenantwort aus.
- Abbildung 4: Schema der Bildung einer Zellwand während der Cytokinese nach Smertenko *et al.* (2017). Durch die Verschmelzung der pektin- und hemizellulosehaltigen Golgi-Vesikel wächst die Zellplatte aus, bis diese die Zellwand der Mutterzelle erreicht. Im Zuge der Reifung wird die Zellplate durch Zellulose stabilisiert......9
- Abbildung 5: Homogalakturonan (HG) und Rhamnogalakturonan (RG I) sowie der Schnittstelle für das jeweilige zellwandmodifizierenden Proteine nach Wang *et al.*, (2018). GalA = Galakturonsäure; Rha = Rhamnose; Gal = Galaktose; Ara = Arabinose; PME = Pektinmethylesterase; PG = Polygalakturonase; PL = Pektatlyase; GAL = β-Galaktosidase; AF = α-L-Arabinofuranosidase......13
- Abbildung 7: Darstellung der Zeitpunkte einer Fruchtprobennahme (PN) und einer 1-Methylcyclopropen (1-MCP)-Behandlung (★) sowie der Beginn und die Dauer der Ethylenbehandlung (-•) in den Versuchsjahren 2012/13 und 2013/14.....21
- Abbildung 8: Ablauf der Gewinnung des Probenmaterials von einer Frucht. Im ersten Schritt wurde die Fruchtfleischfestigkeit in der Äquatorialebene beim Übergang von Sonnen- zu Schattenseite mit einem Penetrometer gemessen nach Entfernung der Schale (⊕). Im zweiten Schritt wurde die Schale um die Äquatorialebene für die Bestimmung der ACO-Aktivität und der Genexpression verwendet. Im dritten Schritt wurde die Äquatorialebene herausgeschnitten und das Fruchtfleisch der Sonnen- und Schattenseite für die Bestimmung der ACS- und GAL-Aktivität sowie ebenfalls zur Genexpression benutzt. Gegenüber der Messstelle der Fruchtfleischfestigkeit wurde ein Stück Fruchtfleisch für die Histologie herausgeschnitten (⊞).
- Abbildung 9: Photometrische Messung der Negativkontrolle der PME-Aktivität nach Kittemann (2012) bei einer Absorbanz von 620 nm.......28 Abbildung 10: Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit [N] der Sorten ,Elstar' (A) und ,Pinova' (B)
- über eine 3-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Der statistische Vergleich (p < 0,05) der Probennahmezeitpunkte im zeitlichen Verlauf einer Behandlung führte zur Einteilung der drei Phase (nichtsignifikante Abnahme (I), signifikante Abnahme (II), nichtsignifikante

- Abbildung 11: Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit [N] der Sorten ,Elstar' (A), ,Pinova' (B) und ,Golden Delicious' (C) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 21) mit Standardabweichung. Der statistische Vergleich (p < 0,05) einzelner der Probennahmezeitpunkte im zeitlichen Verlauf einer Behandlung führte zur Einteilung der drei Phase der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme (nichtsignifikante Abnahme (I), signifikante Abnahme (II), nichtsignifikante Veränderung (III)). Der sigmoidale Verlauf der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme der K-Variante wurde mit der Boltzmann-Funktion (schwarze durchgehende Linie) beschrieben $(r^2 = adjustierte Korrelationskoeffizient; x_0 = Wendepunkt der Funktion).37$
- Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Ethylenproduktion $[\mu] C_2H_4*kg^{-1}*h^{-1}]$ (A, B), ACO-Aktivität [nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹] (C, D) und ACS-Aktivität [nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹] (E, F) der Sorten ,Elstar' (A, C, E) und ,Pinova' (B, D, F) über eine 3-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin dieser Sorten war für die ACO-Aktivität sowie die Ethylenproduktion jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters und für die ACS-Aktivität aufgrund von Nichtsignifikanz der Mittelwert aus Anfang und Ende des sortentypischen Erntefensters. Die Früchte erhielten vor der Analyse eine Akklimatisierung an RT und die Probennahme für die Messung der Ethylenproduktion fand bei 20 °C nach 2 h statt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Originaldaten mit Standardabweichung, wobei nichtsignifikante Behandlungsvarianten zusammengefasst wurden. (A, B) K = unbehandelte Kontrolle (n = 6); M = Mittelwert der 1-MCP-Behandlung am Tag 0 und 7 der Lagerdauer sowie der 1-MCP-Behandlung am Tag 0 und 7 der Lagerdauer mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tage Lagerdauer (n = 24); E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer. (C, D, E, F) K = unbehandelte Kontrolle (n = 3); M0 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer (n = 3); M7 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer (n = 3); E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 3); M0+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 3); M7+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 3). Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf den Beginn einer signifikant

(p < 0,05) erhöhten Enzymaktivität bzw. Ethylenproduktion in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzel-transformierten Daten......40

- Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Ethylenproduktion [µl*kg⁻¹*h⁻¹] (A, B, C), ACO-Aktivität $[n| C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}]$ (D, E, F) und ACS-Aktivität $[nmo| ACC*kg^{-1}*s^{-1}]$ (G, H, I) der Sorten ,Elstar' (A, D, G), ,Pinova' (B, E, H) und ,Golden Delicious' (C, F, I) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf den Beginn einer signifikant (p < 0,05) erhöhten Enzymaktivität bzw. Ethylenproduktion in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzel-transformierten Daten. Fehlende Datenpunkte innerhalb der Zeitreihe beruhen auf einem defekten Gaschromatographen zu diesen Zeitpunkten......43
- Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der Ethylenbiosynthese-Enzyme MdACO1 (A, B), MdACS1 (C, D) und MdACS3 (E, F) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten ,Elstar' (A, C, E) und ,Pinova' (B, D, F) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Post-hoc Test nach der Tukey-Methode berechnet worden sind. Die Berechnungen für die Genexpression von MdACO1 und MdACS1 bei ,Elstar' beruhen auf log-transformierten Daten und von MdACS3 bei ,Pinova' auf Wurzel-transformierten Daten......45
- Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der Ethylenrezeptoren MdETR1 (A, B), MdETR2 (C, D), MdERS1 (E, F) und MdERS2 (G, H) sowie des Signalproteins MdCTR1 (I, J) und des Transkriptionsfaktors MdERF1 (K, L) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten ,Elstar' (A, C, E, G, I, K) und ,Pinova' (B, D, F, H, J, L) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Post-hoc

- Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der GAL-Aktivität [μmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹] der Sorten ,Elstar' (A), ,Pinova' (B) und ,Golden Delicious' (C) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung der Originaldaten. Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf signifikant (p < 0,05) erhöhte Enzymaktivität in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Wert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzeltransformierten Daten........53
- Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der pektinmodifizierenden Enzyme MdPG (A, B), MdPL (C, D), MdGAL (E, F), MdAF1 (G, H) und MdPME (I, J) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten ,Elstar' (A, C, E, G, I) und ,Pinova' (B, D, F, H, J) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Versuchsjahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Post-hoc Test nach der Tukey-Methode berechnet worden sind. Die Berechnungen für die Genexpression von MdGAL sowie MdPG und MdPL bei ,Elstar' beruhen auf log-transformierten Daten.....55 Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der hemizellulose- und
 - zellulosemodifizierenden Proteine MdEXP2 (A, B), MdXTH2 (C, D), MdXTH10 (E, F), MdXYL (G, H) und MdGLU (I, J) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten 'Elstar' (A, C, E, G, I) und 'Pinova' (B, D, F, H, J) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C

- Abbildung 25: Biplot der Hauptkomponentenanalyse 2 für die Variablen Fruchtfleischfestigkeit (FFF), Ethylenproduktion (Ethyl.prod.), ACO-Aktivität (ACO.Akt.) und relative Genexpression der Ethylensignaltransduktions-Gene (ETR1, ETR2, ERS1,ERS2, CTR1, ERF1) des Versuchsjahres 2013/14. Die Eigenvektoren (schwarze Pfeile) weisen die Güte der Gewichte für die Hauptkomponente 1 (PC1) und Hauptkomponente 2 (PC2) aus. Die Punkte zeigen die Verteilung der Sorte "Elstar" (Kreise) und "Pinova" (Dreiecke) an......68

- Abbildung 26: Biplot der Hauptkomponentenanalyse 3 für die Variablen Fruchtfleischfestigkeit (FFF), Ethylenproduktion (Ethyl.prod.), GAL-Aktivität (GAL.Akt.) und relative Genexpression der zellwandmodifizierenden Gene (PG, PL, GAL, AF1, PME, EXP2, XTH2, XTH10, XYL, Egase) des Versuchsjahres 2013/14. Die Eigenvektoren (schwarze Pfeile) weisen die Güte der Gewichte für die Hauptkomponente 1 (PC1) und Hauptkomponente 2 (PC2) aus. Die Punkte zeigen die Verteilung der Sorte ,Elstar' (Kreise) und ,Pinova' (Dreiecke) an......72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erwartetes Verhalten der reiferelevanten Parameter Fruchtfleischfestigkeit,
Ethylenproduktion, Enzymaktivität und Genexpression einer Apfelfrucht im
zeitlichen Verlauf nach der Ernte, im Unterschied zwischen weichwerdenden
(weich) und festbleibenden (fest) Apfelsorten sowie der Vergleich einer
Behandlung mit 1-Methylcyclopropen (1-MCP) oder Ethylen zu einer
Nichtbenandlung. Ψ = nimmt ab/ist geringer; Ψ = steigt an/ ist noner; —= ist unverändert/besteht kein Unterschied
Tabelle 2: Übersicht des Erntezeitnunktes und des zugehörigen Streif-Index (SI) der
Versuchsiahre 2012/13 und 2013/14 für die Sorten Elstar'. Pinova' und Golden
Delicious'
Tabelle 3: Varianten der Behandlung der Versuchsjahre 2012/13 und 2013/14 mit den
Zeitpunkten der 1-Methylcyclopropen (1-MCP)- und Ethylen-Behandlung20
Tabelle 4: Übersicht der Parameter, deren Probenmaterial an derselben Fruchtanzahl einer
Wiederholung gewonnen wurde, und die Zeitpunkte einer Probennahme (PN),
zu dem die Messung stattgefunden hat22
Tabelle 5: Übersicht der verschiedenen Ansätze, um die Verlässlichkeit der photometrischen
Messung der PME-Aktivität zu validieren
Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer für die Bestimmung der Expression der Gene der
Ethylenbiosynthese, Ethylenrezeptoren und
Ethylensignaltransduktionsproteinen nach Harb <i>et al.</i> , (2012) sowie der zellwandmodifizierenden Proteine nach Kittemann (2012)
Tabelle 7: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben
Tag der Lagerdauer der Fruchtfleischfestigkeit des Versuchsiahres 2012/13
während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den
Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des
sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch
verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht
Tabelle 8: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben
Tag der Lagerdauer der Fruchtfleischfestigkeit des Versuchsjahres 2013/14
während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den
Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious'. Der Erntetermin war jeweils der
Antang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$)
Sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht
Tage der Lagerdauer der Ethylenproduktion ACO- und ACS-Aktivität des
Versuchsiahres 2012/13 während einer Lagerung hei 10 °C und normaler
Atmosphäre zwischen den Sorten "Elstar" und "Pinova". Der Erntetermin war
jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede
(p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht
Tabelle 10: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum
selben Tag der Lagerdauer der Ethylenproduktion, ACO- und ACS-Aktivität des
Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler
Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious'. Der
Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters.
Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben
Kenntiicn gemacht
Tabelle 11: Ergebnis der Varianzanalyse der Undenandelten Kontrolle (K-Variante) zum
MdΔCS3 des Versuchsiahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und
normaler Atmosphäre zwischen den Sorten Elstar' und Pinova'. Der

Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters.

- Tabelle15: Ergebnisder Varianzanalyseder unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum
selben Tag der Lagerdauer der Genexpression von MdEXP2, MdXTH2, MdXTH10,
MdXYL und MdEGase des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei
10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der
Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters.
Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben
kenntlich gemacht.56
- Tabelle 16: Übersicht der Übereinstimmung, der in Kapitel 2 formulierten Hypothesen (Hypo.) mit den dargestellten und diskutierten Ergebnissen (Erg.) der Veränderung einer Apfelfrucht im zeitlichen Verlauf nach der Ernte und nach einer Behandlung mit 1-MCP oder Ethylen sowie der Unterschied zwischen weichwerdender (weich) und festbleibender (fest) Apfelsorte auf die reiferelevanten Parameter Fruchtfleischfestigkeit, Ethylenproduktion, Enzymaktivität und Genexpression. ↓ = nimmt ab/ist geringer; ↑ = steigt an/ist höher; — = ist unverändert/besteht kein Unterschied; ✓ = Übereinstimmung; × = keine Übereinstimmung; ~ = nicht einheitlich/eindeutig; nb = nicht bewertbar.82

Abkürzungsverzeichnis

1-MCP	1 Methylcyclopropen				
ACC	1 Aminocyclopropancarboxylsäure				
ACO	ACC Oxidase				
ACS	ACC Synthase				
AF	α-L-Arabinofuranosidase				
AFM	Atomkraftmikroskopie (engl. "atomic force microscopy")				
BKG	Bromkresolgrün				
BLE	Bundesamt für Landwirtschaft und Ernährung				
BTB	Bromthymolblau				
cDNA	komplementäre Desoxvribonukleinsäure (en				
ebra (complementary deoxyribonucleic acid")				
Ct	Zyklusschwellenwerte (engl., cycle threshold")				
СТАВ	Zykiusschweitenweite (engl. "cycle threshold")				
СТР					
dest					
	Credider Mathelianung (and i degree of mathelation()				
DIM	Grad der Methyllerung (engl. "degree of methylation")				
DNAse	Desoxyribonuklease				
	Dithiotreithol				
E3	Ethylen-Behandlung am Tag 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63,				
	70, 77, 84, 91, 98 der Lagerdauer für jeweils 48 h				
E9	Ethylen-Behandlung ab Tag 9 der Lagerdauer				
EDTA	Ethylendiamintetraacetat				
EGase	Endo-Glukanase oder Zellulase, Endo-Glukanasen oder				
	Zellulasen				
ENAP	Essigsäure-Natriumacetat-Puffer				
ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR				
ERS	ETHYLENE RESPONSE SENSOR				
EtOH	Ethanol				
ETR	ETHYLENE RESISTANT				
EXPA	α-Expansin				
GAF	cGMP-spezifischer Phosphodiesterase, Adenylylcylase, FhlA				
GAL	β-Galaktosidase				
GC	Gaschromatographen				
HG	Homogalakturonan				
IFC	Ethylenkonzentration im hohlen Kerngehäuse (engl. "internal				
	ethylene concentration")				
к	Unbehandelte Kontrolle				
КОВ	Kompetenzzentrum Obsthau Bodensee				
MO	1-MCP-Rehandlung am Tag 0 der Lagerdauer				
MO+F9	1-MCP-Behandlung am Tag 0 der Lagerdauer + Ethylen-				
	Behandlung ah Tag 9 der Lagerdauer				
N11+E2	1-MCD-Rehandlung am Tag 1 der Lagerdauer + Ethylen-				
WII+LS	Pohandlung am Tag 2 7 14 21 29 25 42 40 56 62 70 77				
	24. 01. 02 der Lagerdauer für jeweile 42 h				
N47	04, JI, JO UEI LAGEI UAUEI IUI JEWEIIS 40 II 1 MCD Dahandlung am Tag 7 dar Lagardauar				
	1-WCP-Defidituting and Tag. 7. day Lagerdauer				
IVI/+E9	1-ivice-benandlung am rag / der Lagerdauer + Ethylen-				
	Benandlung ab Tag 9 der Lagerdauer				
IVIQ	Malus domestica				
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure				
NPP	Natriumphosphat-Puffer				
PAS	Periodsäure Schiff´sche Reagenz				

PG	Polygalakturonase					
PHIV	Plate-forme d'Histocytologie et d'Imagerie Cellulaire végétale					
PL	Pektatlyase					
PLP	Pyrodoxal-L-Phosphat					
PME	Pektinmethylesterase					
PN	Probennahme					
PNP	p-Nitrophenol					
PNP-GAL	p Nitrophenyl α D galaktopyranosid					
ppm	parts per million					
PVP	Polyvinylpyrrolidon					
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon					
qPCR	Quantitative Echt-Zeit-Kettenreaktion (engl. "quantitative real					
	time reverse transcription polymerase chain reaction")					
RG	Rhamnogalakturonan					
RNA	Ribonukleinsäure (engl. "ribonucleid acid")					
RNAse	Ribonuklease					
RT	Raumtemperatur (22±2 °C)					
SAM	S Adenosylmethionin					
SI	Streif-Index					
SI	Tomate (Solanum lycopersicum L., syn. Lycopersicon					
	esculentum)					
ХТН	Xyloglukan-Endotransglykosylase/ -hydrolase					
XYL	β-Xylosidase					

1. Einleitung

Der Kulturapfel ist die bekannteste Art der Gattung Malus aus der großen Familie der Rosengewächse (Rosacea). Er ist das meist produzierte Obst in Deutschland mit einer Anbaufläche von rund 34.000 ha im Jahr 2017 und einem durchschnittlichen Ertrag von rund 950.000 t geernteter Früchte in den letzten 10 Jahren (statistisches Bundesamt, 2018a,b), wobei die Sorte ,Elstar' am häufigsten angebaut wird (BLE, 2017). Durch die weltweite Produktion von Äpfeln und ihrer Lagerung über mehrere Monate, können Äpfel ganzjährig im Handel angeboten werden. Sowohl für den Transport als auch für die Langzeitlagerung muss die Apfelfrucht eine gute Haltbarkeit aufweisen, die maßgeblich durch die Fruchtfleischfestigkeit bedingt wird. Die Fruchtfleischfestigkeit ist für den Konsumenten zudem eines der wichtigsten Qualitätsparameter, da feste Früchte generell saftiger, knackiger und weniger mehlig sind (Johnston et al., 2002a; Toivonen & Brummell, 2008). Jahrelange Forschung auf zellulärer sowie biochemischer und molekularbiologischer Ebene brachte bereits viele Erkenntnisse über die Gründe des Weichwerdens der Apfelfrucht, jedoch ist die Ursache für den Unterschied in der sortenspezifischen Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit unbekannt. Um dieser Frage nachzugehen, muss das Reifeverhalten verschiedener Sorten verglichen werden, indem die physiologischen Veränderung der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme sowie der Einfluss des Reifungshormons Ethylen untersucht werden.

1.1 Reife

Die Reife wird definiert als eine Summe von physiologischen und biochemischen Prozessen fleischiger Früchte (Giovannoni, 2004; Gapper *et al.*, 2013). Diese Prozesse zeichnen sich im Allgemeinen durch Texturveränderungen, wie einer Reduktion der Fruchtfleischfestigkeit, der Einleitung des Kohlenhydratkatabolismus und der Ausbildung von Aromasubstanzen und Farbstoffen aus, die letztlich zur Genießbarkeit der Früchte führen. Früchte, die ihren Reifebeginn mit einem Anstieg in der Fruchtrespiration und Ethylenproduktion anzeigen, werden als klimakterische Früchte bezeichnet (Abbildung 1). Die Modellpflanze für dieses Fruchtverhalten ist die Tomate (*Solanum lycopersicum L., syn. Lycopersicon esculentum*) (Giovannoni, 2004).

Bei Apfelfrüchten unterscheidet man weiterhin zwischen einer Pflück- und Genussreife (Abbildung 1). Zur Pflückreife sind die Früchte zwar physiologisch reif und lassen sich pflücken, allerdings sind sie noch nicht genießbar, d.h. die Früchte enthalten noch viele Gerbstoffe, haben einen hohen Säuregehalt und wenig Aromastoffe. Die Genussreife erfolgt je nach Sorte entweder unmittelbar im Anschluss an die Pflückreife oder zeitlich versetzt während der

Lagerung der Früchte (Streif, 2002). Es gibt verschiedene Methoden, um die Reife einer Apfelfrucht zu messen und damit den optimalen Erntezeitpunkt zu finden, der einen Kompromiss aus Haltbarkeit und Genussqualität darstellt. Die Bestimmung der Ethylenkonzentration im hohlen Kerngehäuse (engl. "internal ethylene concentration" (IEC)) beispielsweise ist zwar präzise und gibt wieder, ob die Frucht pre- oder postklimakterisch ist, aber sie ist aufwendig und benötigt Laborgeräte, wie einen Gaschromatographen (GC). Dagegen ist der Streif-Index (SI) eine praktikablere und im Feld anwendbare Methode zur Bestimmung der Reife. Im SI wird die Fruchtfleischfestigkeit zusammen mit dem Gehalt an löslicher Trockensubstanz (Refraktometerwert) und dem Stärkeabbauwert in folgender Formel (1) zusammengefasst (Streif, 1996):

$$SI = \frac{Fruchtfleischfestigkeit}{Refraktometerwert*Stärkeabbaustufe}$$
(1)

Das Ergebnis des SI-Quotienten ist eine dimensionslose Zahl, die über mehrere Jahre für einzelne Sorten ermittelt wurde. Auf diese Weise konnte für mehrere Sorte ein Erntefenster auf Basis des SI-Wertes benannt werden, das den Erntebeginn und den Ernteschluss definiert. Aus dieser empirischen Referenztabelle können Empfehlungen abgelesen werden, bei welchem SI-Wert die Früchte einer Sorte für welche Lagerungsmethode geerntet werden sollten (KOB, 2017).



Zeit

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit und der Ethylenproduktion der Tomate während der Fruchtreife nach Giovannoni (2004) sowie die Einteilung der drei Phasen (I, II, III) der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme nach Johnston *et al.* (2002a).

Die Haltbarkeit einer Frucht im Anschluss an die Lagerung (engl. "shelf life") gibt wieder, wie lange diese ohne Qualitätsverluste bei Raumtemperatur (RT; 22±2 °C) gehalten werden kann

(Streif, 2002). Dabei wird ein gutes *shelf life* mit einer geringen Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit assoziiert (Giovannoni, 2001) und die Fruchtfleischfestigkeitsabnahme wiederum steht im Zusammenhang mit der Ethylenproduktion (Costa *et al.*, 2005). Als Fruchtfleischfestigkeit wird hierbei die mechanische Messung des Widerstandes bei Kompression des Fruchtfleisches verstanden (Ruiz-May & Rose, 2013). Die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit während des Reifeverlaufs folgt einer sigmoidalen Funktion (Johnston *et al.*, 2002a), die durch drei Phasen charakterisiert ist (Abbildung 1):

- I. Phase: es erfolgt kein oder lediglich ein geringer Festigkeitsabbau;
- II. Phase: es kommt zu einem schnellen und deutlichen Festigkeitsabbau;
- III. Phase: das Endniveau mit einem Verlust von 25-50 % des Festigkeitsabbaus wird erreicht.

Eine Verlängerung der I. Phase ist möglich durch den Einsatz von 1-Methylcyclopropen (1-MCP), welches an die Ethylenrezeptoren bindet, ohne dabei jedoch eine Ethylenantwort auszulösen, die die Reife vorantreibt (Watkins, 2006). Eine Verkürzung der I. Phase ist durch die Zugabe von Ethylen möglich, welches die Reife beschleunigt und somit auch die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit. Apfelsorten können anhand der Länge der I. Phase in die zwei Festigkeitstypen "festbleibend mit langer I. Phase" und "weichwerdend mit kurzer I. Phase" eingeteilt werden (Johnston *et al.*, 2002a). Eine typischerweise lange festbleibende Sorte ist "Fuji" (Tatsuki *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010; Wang & Xu, 2012), eine typisch schnell weichwerdende Sorte hingegen "Golden Delicious" (Wei *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013; Sunny *et al.*, 2016).

Neben einer Einteilung in die Festigkeitstypen, kann eine Einordnung anhand einer Verkürzung der I. Phase durch Ethylen- oder Kältereiz erfolgen. Hierbei werden die drei Kategorien des Weichwerdens unterschieden (Johnston *et al.*, 2002b; Kittemann, 2012):

1. Kategorie: Kurze I. Phase, unabhängig von der Reizung;

- 2. Kategorie: Lange I. Phase, die durch die Reizung verkürzt wird;
- 3. Kategorie: Lange I. Phase, unabhängig von der Reizung.

So sind die Sorten der Kategorien 1 und 3 ethyleninsensitiv und die Sorten der Kategorie 2 ethylensensitiv. Sorten, die der Kategorie 1, 2 und 3 entsprechen, sind "Golden Delicious" (Wei *et al.*, 2010), "Granny Smith" (Johnston *et al.*, 2002b) und "Fuji" (Wei *et al.*, 2010).

Da die Pflückreife beim Apfel durch Ethylen initiiert wird und mit zunehmender Reife ein Abbau der Fruchtfleischfestigkeit erfolgt, dessen Beginn aber je nach Sorte variiert, muss es einen Zusammenhang zwischen der Ethylenproduktion sowie der Ethylensensitivität zur Fruchtfleischfestigkeit geben. Um diesem Zusammenhang nachgehen zu können, muss zuerst der Ablauf der fruchteigenen Ethylenproduktion sowie die Reaktion auf Ethylen bekannt sein.

1.2 Ethylen

Ethylen ist ein Phytohormon, das für die Entwicklung der Pflanze essentiell ist und als Stressoder Reifungshormon vielfältige physiologische Prozesse steuert. Alle Pflanzen produzieren Ethylen in der Ethylenbiosynthese und reagieren mit einer Ethylenantwort über die Ethylensignaltransduktion (Zemlyanskaya *et al.*, 2017). Höheren Pflanzen werden zwei Ethylensysteme zugeschrieben. Die Produktion von Ethylen im System 1 erfolgt während der vegetativen Entwicklung sowie bei Stress, im System 2 dagegen während der generativen Entwicklung und Fruchtreife. Das System 1 arbeitet autoinhibitorisch und inhibiert seine Synthese, das System 2 arbeitet im Unterschied dazu autokatalytisch und stimuliert die Synthese (Barry & Giovannoni, 2007).

1.2.1 Ethylenbiosynthese

Die maßgeblichen Enzyme der Ethylenbiosynthese sind die ACC-Synthase (ACS), die S-Adenosylmethionin (SAM) zu 1-Aminocyclopropancarboxylsäure (ACC) katalysiert, und die ACC-Oxidase (ACO), die aus ACC Ethylen formt. Das Substrat der ACS stammt ursprünglich von der Aminosäure Methionin. Die Umsatzrate in der Bildung von Ethylen wird hauptsächlich von der ACS kontrolliert (Vanderstraeten & Van Der Straeten, 2017). In der Apfelfrucht befindet sich die ACS vorwiegend im Fruchtfleisch und die ACO eher in der Schale (Lara & Vendrell, 2003; Vilaplana *et al.*, 2007). Apfelsorten weisen ein unterschiedliches Spektrum an der Menge des produzierten Ethylens auf (Brackmann & Streif, 1994). Dabei ist ,Fuji' typischerweise ein niedriger und ,Golden Delicious' ein hoher Ethylenproduzent (Brackmann & Streif, 1994; Wakasa et al., 2006).

Von den entsprechenden Genen der Ethylenbiosynthese-Enzyme besitzt der Apfel 19 unterschiedliche ACS- (Li *et al.*, 2013) und 4 ACO-Gene (Wiersma *et al.*, 2007). Allerdings stehen von diesen insgesamt 23 Genen nur 3 mit der Fruchtreife im Zusammenhang. Hiervon werden MdACS1 und MdACO1 erst zur Pflückreife exprimiert (Wiersma *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Harb *et al.*, 2012) und MdACS3a bereits bis zu 6 Wochen vorher (Wiersma *et al.*, 2007; Varanasi *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013). Angesichts der geringen Anzahl an Studien mit mehreren Sorten ist eine Einteilung der Genexpression von MdACS3a, MdACS1 und MdACO1 zum Festigkeitstyp nicht zweifelsfrei möglich. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen lässt sich nur vermuten, dass die Expression von MdACS3a keinen Bezug zum Festigkeitstyp hat (Varanasi *et al.*, 2011), aber die Expression von MdACS1 und MdACO1 in weichwerdenden Sorten höher ist als in festbleibenden (Tatsuki *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2013).

Aufgrund des unterschiedlichen Zeitpunktes der Expression von MdACS3a und MdACS1, wird MdACS3a dem Ethylensystem 1 und MdACS1 dem Ethylensystem 2 zugeordnet (Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013). Daraus wird geschlossen, dass die Initiierung der Reife

mit dem Anstieg der Expression von MdACS3a erfolgt und die Reife erst mit dem Erreichen bzw. Überschreiten des Maximums beginnt und somit die Expression von MdACS3a den Übergang vom Ethylensystem 1 zu 2 steuert.

Die Behandlung reifer Früchte mit 1-MCP während der autokatalytischen Phase (Ethylensystem II) führt zu einer Hemmung der Genexpression von MdACS1 und MdACO1 (Tatsuki *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013) und zu einer reduzierten Enzymaktivität, die vermutlich aus einer geringeren Menge an translatiertem ACS- und ACO-Protein resultiert (Tian *et al.*, 2002; Vilaplana *et al.*, 2007). Die Genexpression von MdACS3a dagegen wird nicht durch 1-MCP beeinflusst (Varanasi *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013). Die Zugabe von exogenem Ethylen auf reife Früchte fördert die Genexpression von MdACS1 und MdACO1 (Yang *et al.*, 2013) und sollte auch deren Enzymaktivität fördern. Dagegen wird die Genexpression von MdACS3a durch Ethylen gehemmt (Tan *et al.*, 2013). Bislang unklar ist, ob die 1-MCP-und Ethylen-Wirkung auf festbleibende und weichbleibende Sorten generell unterschiedlich ist oder in Abhängigkeit der Höhe der Ethylenproduktion steht und ob sich diese Unterschiede auch im Bereich der Ethylensignaltransduktion widerspiegeln.

1.2.2 Ethylensignaltransduktion

Die Pflanze reagiert auf Ethylen je nach Entwicklungszustand und Gewebe mit einer mannigfaltigen Ethylenantwort. Die Ethylenantwort beginnt mit der Bindung des Ethylens an die Ethylenrezeptoren, die aus drei Elementen aufgebaut sind (Abbildung 2):

- 1. Die N-terminale transmembrane Domäne, die die Ethylen-Bindungsstelle formiert;
- Die GAF-Domäne, die aus den drei Proteinen cGMP-spezifischer Phosphodiesterase, Adenylylcylase und FhIA besteht und f
 ür die Bindung zwischen den Ethylenrezeptoren sorgt;
- 3. Die C-terminale Kinase, die über Phosphorylierung andere Proteine aktiviert und um eine Empfänger-Domäne ergänzt sein kann.

Pflanzen besitzen mehrere unterschiedliche Ethylenrezeptoren, die sich anhand der in ihnen enthaltenden Elemente unterscheiden. Durch diese Unterscheidung werden die Ethylenrezeptoren in zwei Gruppen eingeteilt (Lacey & Binder, 2014) (Abbildung 2): Bei den Ethylenrezeptoren der Gruppe I besteht die erste Einheit aus drei transmembranen Schleifen, die der Gruppe II besitzen eine Schleife mehr, wobei diese vierte Schleife vermutlich als Signalsequenz fungiert. Die dritte Einheit, die C-terminale Kinase, ist eine Histidin Kinase, die in der Gruppe I voll funktionsfähig ist, der aber in der Gruppe II einige funktionelle Elemente fehlen (Shakeel *et al.*, 2013).



Abbildung 2: Allgemeine Struktur der Ethylenrezeptoren und der spezielle Aufbau der Gruppe I- und II-Ethylenrezeptoren nach Shakeel *et al.* (2013); GAF= cGMP-spezifischer Phosphodiesterase, Adenylylcylase und FhIA; ED = Empfänger-Domäne.

Das aktuelle Modell des Ethylensignaltransduktionsweges folgt einem nahezu linearen Ablauf (Abbildung 3). Die erste Einheit der Ethylenrezptoren befindet sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Die zweite und dritte Einheit ragen ins Cytosol der Zelle. Um Ethylen binden zu können, müssen zwei Ethylenrezeptoren mittels Disulfid-Brücken einen Homodimer bilden. Alle Ethylenrezeptoren sind in der Lage, Ethylen in Anwesenheit von einem Kupfer-Ion zu binden (Lacey & Binder, 2014). Über die zweite Einheit des Ethylenrezeptors können sich verschiedene Ethylenrezeptordimere miteinander verbinden und so einen Komplex bilden, welcher der Signalverstärkung und der Feinabstimmung der Ethylenantwort dient (Kendrick & Chang, 2008). Weiterhin wurde experimentell festgestellt, dass eine Reduzierung der Anzahl der Rezeptoren zu einer erhöhten Ethylensensitivität und umgekehrt führt (Tieman et al., 2000; Hall & Bleecker, 2003; Kevany et al., 2007). Die Signalweiterleitung nach der Bindung von Ethylen erfolgt vorrangig über die Proteinkinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR) 1. CTR1 kann mit allen Ethylenrezeptoren physisch interagieren, jedoch interagiert CTR1 stärker mit den Rezeptoren der Gruppe I, die eine voll funktionsfähige dritte Einheit besitzen. Auch die Empfänger-Domäne scheint eine wichtige Rolle in der Modulation der Ethylenantwort zu spielen (Shakeel et al., 2013). Solange Ethylen nicht gebunden ist, ist der Ethylenrezeptor inaktiv und CTR1 aktiv. Erst mit der Bindung von Ethylen geht im Ethylenrezeptor eine Konformitätsveränderung vor und inaktiviert somit CTR1. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die dazu führt, dass die Expression der ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)-Gene im Zellkern beginnt (Ju & Chang, 2015). Das Translationsprodukt der ERF-Gene sind Transkriptionsfaktoren, die die Regulierung der ethylenresponsiven Gene steuern. Dies sind in der reifen Frucht beispielsweise Gene, die die Ethylenproduktion, die Texturveränderung oder die Aromabildung regulieren. Mit der Aktivierung der ERF-Gene endet der Ethylensignaltransduktionsweg (Liu et al., 2015).



Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Entstehung der Ethylenantwort nach Shakeel *et al.* (2013) und Ju & Chang (2015). Sobald Ethylen (C₂H₄) an den Ethylenrezeptor bindet, dessen Bindungsstelle sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet, wird die Proteinkinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) aktiviert und löst eine Signalkaskade aus, die im Zellkern die Expression der ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)-Gene startet. Deren Produkt, die ERF-Transkriptionsfaktoren, lösen die Expression der diversen Gene der Ethylenantwort aus.

Beim Apfel sind 9 Ethylenrezeptor-Gene bekannt. Hierbei gehören Md-ETHYLENE RESISTANT (ETR) 1, MdETR1b, MdETR101, Md-ETHYLENE RESPONSE SENSOR (ERS) 1 und MdERS2 zur Gruppe I und MdETR2, MdETR102, MdETR5 und MdETR105 zur Gruppe II (Ireland et al., 2012). Allerdings werden in den meisten Studien lediglich MdERT1, MdETR2 sowie MdERS1 und MdERS2 betrachtet. Die Mehrheit der Studien belegt keine Veränderung im Reifeverlauf in der Expression von MdETR1 (Wiersma et al., 2007; Tatsuki et al., 2007, 2009; Li et al., 2010; Harb et al., 2012; Varanasi et al., 2013; Yang et al., 2013) oder von MdCTR1 (Dal Cin et al., 2006; Li et al., 2010; Harb et al., 2012; Yang et al., 2013). Dagegen steigt die Expression von MdETR2 (Wiersma et al., 2007; Li et al., 2010; Varanasi et al., 2013; Yang et al., 2013) und MdERS2 im Verlauf der Reife an (Tatsuki et al., 2009; Li et al., 2010; Varanasi et al., 2013; Yang et al., 2013). Über die Expression von MdERS1 während der Reife existieren sowohl für dieselbe Sorte (Dal Cin et al., 2006; Wiersma et al., 2007; Li et al., 2010; Varanasi et al., 2013; Yang et al., 2013), als auch für verschiedene Sorten unterschiedliche Beobachtungen (Wiersma et al., 2007; Harb et al., 2012), die von einem konstanten Verlauf bis hin zu einem Anstieg während der Reife führen. Die Genexpression des Transkriptionsfaktors MdERF1 nimmt je nach Sorte zu (Wang et al., 2007; Harb et al., 2012; Yang et al., 2013) oder bleibt konstant niedrig (Wang et al., 2007; Harb et al., 2012). Aufgrund der Existenz nur weniger sortenvergleichender Studien ist eine Einteilung der Genexpression zu den Festigkeitstypen nicht eindeutig, trotzdem ist eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass die Genexpression von MdETR1 (Tatsuki *et al.*, 2007) und MdCTR1 (Li *et al.*, 2010) nicht mit den Festigkeitstypen in Zusammenhang steht, aber die Genexpression von MdETR2 (Li *et al.*, 2010) und MdERF1 (Wang *et al.*, 2007) in weichwerdenden Sorten höher ist als in festbleibenden. Weiterhin zeigt sich eine Tendenz in Genexpression von MdERS1 (Tatsuki *et al.*, 2009; Harb *et al.*, 2012) und MdERS2 (Tatsuki *et al.*, 2007, 2009) mit höheren Werten bei festbleibenden Sorten als bei weichwerdenden.

Unabhängig von der Sorte ist belegt, dass die Genexpression von MdETR2, MdERS1, MdERS2 (Dal Cin *et al.*, 2006; Tatsuki *et al.*, 2007; Varanasi *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013) und MdERF1 (Wang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013) durch 1-MCP reduziert wird. Die Wirkung von 1-MCP auf MdETR1 und MdCTR1 ist nicht eindeutig. Einige Studien deuten hingegen weder auf eine Veränderung in der Genexpression von MdETR1 (Tatsuki *et al.*, 2009; Varanasi *et al.*, 2013) bzw. MdCTR1 (Dal Cin *et al.*, 2006) noch auf eine Abnahme mit zunehmender Reife bei MdETR1 (Dal Cin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013) bzw. bei MdCTR1 (Yang *et al.*, 2013) hin. Während des *Shelf lifes* fördert die Zugabe von exogenem Ethylen die Expression von MdETR1, MdETR2, MdERS1, MdERS2 und MdERF1, wobei die Erhöhung der Expression von MdETR1 deutlich geringer ist als bei den anderen Rezeptoren (Yang *et al.*, 2013).

Die Unterschiede im Festigkeitstyp ergeben sich demzufolge bereits durch eine differenzierte Ethylenbiosynthese als auch Ethylenantwort. In welcher Weise sich diese auf die Veränderung der Fruchtfleischfestigkeit auswirken, muss durch Aufklärung der Zellwandveränderung untersucht werden.

1.3 Zellwand

Man nimmt an, dass die Fruchtfleischfestigkeit hauptsächlich durch die Zellarchitektur und den Zellturgor der Parenchymzellen des Kortex fleischiger Früchte bestimmt wird. Dabei beschreibt die Zellarchitektur die Zusammensetzung der Zellwand sowie die Form und Größe der Zellen und Interzellularen (Harker *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 2002a; Ruiz-May & Rose, 2013). Bei Apfelfrüchten tendieren Sorten mit größeren Zellen (Johnston *et al.*, 2002a; Allan-Wojtas *et al.*, 2003; Dong & Song, 2004) oder Interzellularen zu einer geringeren Fruchtfleischfestigkeit (Allan-Wojtas *et al.*, 2003; Dong & Song, 2004; McAtee *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2013). Die Zusammensetzung der Zellwand variiert je nach Entwicklungsstand des Gewebes und wird in Abhängigkeit von biotischen und abiotischen Faktoren durch zellwandmodifizierende Proteine auf-, um- oder abgebaut (Caffall & Mohnen, 2009; Ruiz-May & Rose, 2013). Daher ist es notwendig, neben dem Zellwandaufbau auch die für die Fruchtreife relevanten zellwandmodifizierenden Proteine näher zu betrachten.

1.3.1 Aufbau und Zusammensetzung der Zellwand

Die Zellwand besteht aus den Zellwandkomponenten Pektin, Hemizellulose und Zellulose, sowie Strukturproteinen (Caffall & Mohnen, 2009; Ruiz-May & Rose, 2013). Die pflanzliche Zellwand bildet sich nach erfolgreicher Mitose während der Cytokinese aus der Zellplatte heraus (Abbildung 4). Die Zellplatte besteht zunächst aus einer Ansammlung von Strukturproteinen und Golgi-Vesikeln, die pektin- und hemizellosehaltiges Material enthalten. Durch die Verschmelzung der Golgi-Vesikel wächst die Zellplatte weiter aus und wird im Zuge der Reifung durch Zellulose verstärkt. Sobald die so gereifte Zellplatte die Zellwand der Mutterzelle erreicht hat, ist eine neue Zellwand entstanden, die nun die Tochterzellen separiert (Drakakaki, 2015).



Golgi-Vesikel

Abbildung 4: Schema der Bildung einer Zellwand während der Cytokinese nach Smertenko *et al.* (2017). Durch die Verschmelzung der pektin- und hemizellulosehaltigen Golgi-Vesikel wächst die Zellplatte aus, bis diese die Zellwand der Mutterzelle erreicht. Im Zuge der Reifung wird die Zellplate durch Zellulose stabilisiert.

Die so neu entstandene Zellwand besteht bei Früchten aus zwei Schichten, der Mittellamelle, die benachbarte Zellen verbindet, und der ihr innen anliegenden Primärwand. Die Grenzen dieser zwei Schichten gehen dabei ineinander über. Pektin ist Hauptbestandteil der Mittellamelle und Hemizellulose sowie Zellulose der Primärwand. Die einzelnen Zellwandkomponenten sind komplexe Polymere, die vielfältig miteinander verbunden sind (Caffall & Mohnen, 2009; Ruiz-May & Rose, 2013).

Pektin

Pektin besteht aus mehreren Gruppen von Polysacchariden, denen ein Gerüst aus Galakturonsäuremonomeren gemein ist. Bei Früchten werden 4 Gruppen unterschieden, von denen lediglich zwei eine tragende Rolle während der reifebedingten

Fruchtfleischfestigkeitsabnahme spielen (Ruiz-May & Rose, 2013). Dies ist zum einen (HG), Homogalakturonan welches ein lineares Polymer aus bis zu 100 Galakturonsäuremonomeren ist, die verschieden stark mit Methylestern und Acetylresten versehen sind, und zum anderen Rhamnogalakturonan (RG) I, welches ein heterogenes Polymer ist, das alternierend aus Galakturonsäure und Rhamnose besteht. Die Rhamnoseeinheit kann Seitenketten aus Zuckern, wie Galaktose oder Arabinose, tragen (Caffall & Mohnen, 2009).

Je nach der Zusammensetzung der Pektinpolymere bildet sich ein mehr oder weniger hydratisiertes Gel aus, welches die Porosität der Zellwand bestimmt und im Gegenzug Einfluss auf die Festigkeit und Stabilität der Zellwand nimmt. Die Porosität bestimmt daneben auch den Austausch von Zellflüssigkeit und enthaltener Moleküle zwischen Apoplast und Protoplast. Je hydratisierter das Gel ist, desto poröser und flexibler ist die Zellwand, aber desto geringer ist die Festigkeit und Stabilität der Zellwand (Bidhendi & Geitmann, 2016). Obwohl noch vieles über die Funktion und Bindung der einzelnen Pektinpolymere unbekannt ist, so konnten folgende Auswirkungen der Bindung der Pektinpolymere auf die Zellwand gezeigt werden:

HG-Quantität:

Die Menge an HG beeinflusst die Flexibilität der Pektinpolymere. Je weniger HG in der Zellwand vorkommt, desto flexibler ist die Zellwand (Levesque-Tremblay *et al.*, 2015). Grad der Methylierung (engl. "degree of methylation" (DM)) des HGs:

HGs werden mit einem hohen DM im Golgi synthetisiert und erst in der Zellwand wird der DM enzymatisch reduziert (Bidhendi & Geitmann, 2016). Je höher der DM ist, desto hydratisierter ist das Pektingel (Levesque-Tremblay *et al.*, 2015). Infolge enzymatischer Entfernung der Methylgruppen entstehen an den HG-Strängen negativ geladene Carboxyl-Gruppen, die sich gegenseitig abstoßen und damit die Porosität erhöhen. An diesen negativ geladenen Gruppen bilden sich bei ausreichender Kalziumversorgung der Pflanze über Kalziumionen die sogenannten Eierkarton- (engl. "egg box") Strukturen aus. Diese ionische Bindung der HG-Stränge sorgt für einen starken Zusammenhalt der Pektinpolymere und erhöht damit die Festigkeit der Zellwand (Hocking *et al.*, 2016).

Seitenketten des RG I:

Die Seitenketten am RG I wirken wie Anker, die die Pektinpolymere in der Zellwand befestigen (Caffall & Mohnen, 2009; Paniagua *et al.*, 2014; Bidhendi & Geitmann, 2016) und so zur Flexibilität der Zellwand beitragen. Gleichzeitig sorgt die Kettenlänge für eine Stabilität dieser Ankerwirkung, die mit abnehmender Kettenlänge nachlässt (Brummell, 2006). Welcher Zucker als Seitenkette des RG I angehängt ist, beeinflusst die Gelierung des Pektins. So erhöht galaktanreiches RG I im Vergleich zu arabinanreichem RG I die

Festigkeit der Zellwand, arabinanreiches RG I dagegen erhöht die Porosität der Zellwand (Bidhendi & Geitmann, 2016).

Die Zusammensetzung der Pektinpolymere bestimmt somit wie porös und flexibel die Pektinmatrix ist und damit positiv den Flüssigkeitsaustausch zwischen Apo- und Protoplast. Allerdings stehen diese Porosität und Flexibilität im negativen Kontrast zur Festigkeit und Stabilität der Zellwand.

Hemizellulose

Hemizellulosen umfassen eine strukturell heterogene Gruppe von Polysacchariden, die wenig oder nicht verzweigt sind, wie beispielsweise Xyloglukane, Xylane oder Mannane. Hemizellulosen werden wie Pektinpolymere im Golgi synthetisiert und via Vesikel zum Apoplasten transportiert. Hemizellulosen umhüllen über Wasserstoffbrücken die Zellulosemikrofibrillen. Dies führt zwar zu einer Schwächung der Zugfestigkeit des Zellulosenetzwerks, gleichzeitig wird aber die Flexibilität des Zellulosenetzwerks erhöht. Hemizellulosen binden ebenso an Pektinpolymere und sorgen damit für eine Einbettung des Zellulosenetzwerkes in die Pektinmatrix (Caffall & Mohnen, 2009). Xyloglukan ist das häufigste Hemizellulose-Polysaccharid in der Zellwand von Dikotylen. Xyloglukan besteht aus einem Glukosegerüst, an das Xyloseeinheiten geknüpft sind. An diese Xyloseeinheiten können weitere Zucker wie Galaktose angehängt werden (Park & Cosgrove, 2015).

Zellulose

Zellulose besteht aus langen Ketten von Glukoseeinheiten und wird von Zellulosesynthasekomplexen synthetisiert, die sich in dem Plasmalemma befinden. Die Glukoseketten vereinen sich zu Mikrofibrillen, die sich netzartig anordnen. Die Mikrofibrillen sorgen für die hohe Zugkraft der Zellwand, die sie sehr stabil, aber auch unflexibel macht (Ruiz-May & Rose, 2013; Bidhendi & Geitmann, 2016). Die Zellulosemikrofibrillen sind durch ihre Anordnung relativ resistent gegenüber enzymatischem Abbau (Bonnin & Lahaye, 2013).

Strukturptoteine

Strukturproteine kommen zu einem geringen Anteil in der Zellwand vor und bestehen aus einer Gruppe von Glykosiden, die einen mehr oder weniger proteinhaltigem Charakter haben. Ihnen wird eine tragende Rolle in der Zellwandverstärkung zugesprochen (Caffall & Mohnen, 2009; Ruiz-May & Rose, 2013).

Der Verbund aus Pektinpolymeren, Hemizellulosen, Zellulose und Strukturproteinen sorgen so gleichermaßen für Elastizität und Flexibilität als auch für Stabilität und Festigkeit der Zellwand.

Damit die Frucht während des Wachstums und der Reife an abiotischen und biotischen Faktoren anpassen kann, unterliegt die Zellwand zahlreichen Veränderungen.

1.3.2 Veränderung der Zellwand während der Fruchtreife

Während des Wachstums benötigt die Frucht vorrangig flexible Zellwandverbindungen und in der ausgewachsenen Frucht dann eher stabile Verbindungen (Caffall & Mohnen, 2009). Die zunehmende Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit während der Fruchtreife der ausgewachsenen Frucht diente ursprünglich vermutlich der Steigerung der Attraktivität der Frucht für Tiere, damit diese zur Samenvermehrung beitragen (Giovannoni, 2004). Diese Abnahme wird hervorgerufen durch einen Verlust des Zell-Zell-Zusammenhalts und Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Zellwand, die wiederum verursacht werden durch die Depolymerisation der Zellwandkomponenten und ihrer Solubilisierung durch zellwandmodifizierende Proteine (Johnston et al., 2002a; Paniagua et al., 2014). Dabei ist die pektinreiche Mittellamelle, welche die Zell-Zell-Verbindung herstellt, der maßgebliche Ort für die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit. Wesentliche Veränderungen in der Pektinmatrix erfolgen durch enzymatischen Ab- und Umbau (Ruiz-May & Rose, 2013; Paniagua et al., 2014). Den folgenden zellwandmodifizierenden Proteinen werden dabei die wichtigsten reifebedingten Veränderungen der pektinhaltigen Zellwandbestandteile in der Frucht zugesprochen (Abbildung 5):

Polygalakturonase:

Polygalakturonasen (PG) sind Enzyme, die durch Hydrolyse die glykosidische Bindung der Galakturonsäureeinheiten im HG-Gerüst auflösen. Dabei katalysierten endo-PGs diese Reaktion zwischen den Galakturonsäureeinheiten, wobei kürzere HGs produziert werden, und exo-PGs agieren von der terminalen Position des HG-Gerüstes, wobei Galakturonsäuremonomere entstehen (Senechal *et al.*, 2014). Essenziell für die PG-Aktivität ist ein niedriger DM des HG-Gerüstes (Senechal *et al.*, 2014; Levesque-Tremblay *et al.*, 2015). Dabei konnte für den Apfel nachgewiesen werden, dass das Gen MdPG1 eine tragende Rolle im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit hat (Atkinson *et al.*, 2012). Pektatlyase:

Pektatlyasen (PL) sind Enzyme, deren Substrat ebenfalls HGs mit einem niedrigem DM sind, allerdings spalten PLs die Galakturonsäureeinheiten mittels β -Elimination, so dass kürzere HGs entstehen (Bonnin *et al.*, 2014; Senechal *et al.*, 2014). Über die Anzahl der PL-Gene im Apfel ist nichts bekannt. Bei der Tomate sind 22 Gene bekannt, von denen lediglich eines in der reifen Frucht exprimiert wird (Yang *et al.*, 2017) β-Galaktosidase:

β-Galaktosidasen (GAL) sind Enzyme, die vom nicht reduzierten Ende der Galaktankette die Galaktosyleinheiten hydrolysieren, so dass Galaktosemonomere entstehen und die Galaktankette sich verkürzt. Beim Apfel sind mehrere Gene bekannt, von denen die Expression von MdGAL1 zur Reife am stärksten ansteigt (Yang *et al.*, 2018).

α-L-Arabinofuranosidase:

 α -L-Arabinofuranosidasen (AF) sind Enzyme, welche die Arabinofuranosyleinheiten vom nicht-reduzierenden Ende der Arabinankette hydrolysieren, so dass Arabinosemonomere frei werden und sich die Arabinankette verkürzt (Tateishi, 2008). In der Apfelfrucht werden drei Gene exprimiert, von denen MdAF1 und MdAF3 während der Reife ansteigen (Nobile *et al.*, 2011; Storch *et al.*, 2015).

Pektinmethylesterase:

Pektinmethylesterasen (PME) sind Enzyme, welche die Methylester unter Freiwerdung eines Protons und Methanols am HG-Gerüst entfernen, wobei an der Galacturonsäureeinheit eine negativ geladene Carboxlgruppe entsteht (Levesque-Tremblay *et al.*, 2015). In der reifen Apfelfrucht konnten bisher drei Gene identifiziert werden, von denen MdPME1 am stärksten exprimiert wird (Gwanpua *et al.*, 2016b).



Abbildung 5: Homogalakturonan (HG) und Rhamnogalakturonan (RG I) sowie der Schnittstelle für das jeweilige zellwandmodifizierenden Proteine nach Wang *et al.*, (2018). GalA = Galakturonsäure; Rha = Rhamnose; Gal = Galaktose; Ara = Arabinose; PME = Pektinmethylesterase; PG = Polygalakturonase; PL = Pektatlyase; GAL = β-Galaktosidase; AF = α-L-Arabinofuranosidase.

Da auch die anderen Zellwandkomponenten ihren Teil zur Zellwandstabilität und damit zur Fruchtfleischfestigkeit beitragen, ist nicht nur die Pektindepolymerisation relevant für die Fruchtfleischfestigkeitsabnahme, sondern auch die Veränderung des Verbundes aus Hemizellulose, Zellulose und Strukturproteinen (Payasi *et al.*, 2009). Die hierbei maßgeblichen zellwandmodifizierenden Proteine in der reifen Frucht sind (Abbildung 6):

α-Expansin:

α-Expansine (EXPA) sind im Gegensatz zu den bisher genannten zellwandmodifizierenden Proteinen keine Enzyme, sondern gehören zu den Strukturproteinen. EXPAs trennen pHgesteuert die Bindung zwischen Zellulose und Hemizellulose und erhöhen somit die Porosität der Zellwand ohne Reduzierung der Stabilität und Festigkeit (Cosgrove, 2015, 2016; Marowa *et al.*, 2016). Von den 34 bekannten EXPA-Genen im Apfel (Zhang *et al.*, 2014) spielen lediglich die Expression von MdEXP2 und MdEXP3 in der reifen Frucht eine Rolle (Trujillo *et al.*, 2012). Dabei ist die Expression von MdEXP3 lediglich zur Pflückreife erhöht (Goulao *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2012).

Xyloglukan-Endotransglykosylase/ -hydrolase:

Xyloglukan-Endotransglykosylasen/ -hydrolasen (XTH) sind Enzyme, welche die interne Bindung der Glukankette des Xyloglukans spalten. Dabei wird das abgeschnittene Xyloglukan entweder an ein weiteres Xyloglucanpolymer (Transglykosylase) geknüpft, das zum Umbau der Hemizellulosematrix führt, oder mit Wasser (Hydrolase) gebunden wird, womit die Xyloglukankette irreversibel verkürzt und damit die Zellwandporosität erhöht wird (Brummell & Harpster, 2001; Rose *et al.*, 2002; Eklöf & Brumer, 2010). Im Apfel sind 11 Gene bekannt, von denen MdXTH2 und MdXTH10 besonders hoch in reifen Früchten exprimiert werden (Atkinson *et al.*, 2009).

β-Xylosidase:

 β -Xylosidasen (XYL) sind Enzyme, welche die Xyloseeinheiten vom nicht-reduzierden Ende der Xylooligosachharide spalten, so dass Xylosemonomere entstehen und die Xylosekette verkürzt wird (Cleemput *et al.*, 1997). Über die Anzahl an XYL-Genen oder deren Expression beim Apfel ist nichts bekannt, dagegen sind bei der Tomate zwei XYL-Gene bekannt, von denen lediglich die Expression von LeXYL1 nach der Reife ansteigt (Itai *et al.*, 2003).

Endo-Glukanase oder Zellulase:

Endo-Glukanasen oder Zellulasen (EGase) sind Enzyme, welche die interne Bindung der Glukoseeinheiten der Zellulose als auch der Hemizellulose hydrolysieren, so dass diese Ketten kürzer werden (Levy *et al.*, 2002). Beim Apfel ist lediglich ein EGase-Gen bekannt (Li *et al.*, 2010), dessen Expressionsverlauf mit zunehmender Reife je nach Sorte unterschiedlich verläuft (Li *et al.*, 2010; Li & Yuan, 2008).



 Abbildung 6: Verknüpfung der Pektinmatrix mit dem Zellulosenetzwerk über Hemizellulosestrukturen und die Schnittstellen der jeweiligen zellwandmodifizierenden Proteine nach Fry (1994), Bonnin & Lahaye (2013) und Park & Cosgrove (2015). EXPA = α-Expansin; EGase = Endo-Glukanase; XYL = β-Xylosidase; XTH = Xyloglukan-Endotransglykosylase/ -hydrolase.

All diese zellwandmodifizerenden Proteine sorgen vermutlich synergistisch für die Depolymerisation und Solubilisierung der Zellwand, indem die Porosität der Zellwand zunimmt und damit auch die Substratverfügbarkeit der Zellwandkomponenten für ihre jeweiligen modifizierenden Proteine (Payasi & Sanwal, 2010; Paniagua et al., 2014; Bidhendi & Geitmann, 2016; Hocking et al., 2016). Die Fruchtfleischfestigkeit von reifen Apfelfrüchten wird somit erst einmal durch die Zusammensetzung der Zellwandpolymere und anschließend durch deren Degradation bestimmt. Die Zellwandbeschaffenheit bestimmt über die direkte Festigkeit der Zellwand hinaus auch die Form und Größe der Zelle, die über ihren Verbund weiteren Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit ausübt. Daher ist anzunehmen, dass die Unterschiede im Festigkeitstyp von Apfelsorten sowohl durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellwand sowie der Zellform als auch durch eine unterschiedliche Regulation der zellwandmodifizierenden Proteinen bestehen. Da die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit zeitlich mit der Reife und damit der Ethylenproduktion von Äpfeln einhergeht, ist anzunehmen, dass bei ethylensensitiven Sorten eine Beeinflussung der Früchte durch 1-MCP oder Ethylen eine Auswirkung auf die Degradation der Zellwand sowie Zellform als auch der Regulation der zellwandmodifizierenden Proteine hat.

2. Ziel dieser Arbeit

Nach wie vor ist unklar, worin die sortentypische Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit im Reifeverlauf von Apfelfrüchten besteht. Um diese zu ergründen werden Apfelsorten verwendet, die sich in ihrem Festigkeitsverlauf und ihrer Ethylenproduktion in der Nach-Ernte-Phase unterscheiden. Dabei gelten ,Elstar' und ,Golden Delicious' als weichwerdende und ,Pinova' als festbleibende Sorte. Weiterhin zählen ,Elstar' und ,Pinova' zu den geringen und ,Golden Delicious' zu den hohen Ethylenproduzenten. Weiterhin werden mittels des Reifeinhibitors 1-Methylcyclopropen (1-MCP) sowie des Reifeförderers Ethylen die Ethylensensitivität dieser Sorten geprüft und der Einfluss dieser Behandlungen auf einige reiferelevanten Parameter betrachtet. Neben der Bestimmung der Fruchtfleischfestigkeit, hier als zentrales Merkmal der reiferelevanten Parameter, werden neben der fruchteigenen Ethylenproduktion, die Genexpression sowie Aktivität der Ethylenbiosynthese-Enzyme als auch die Genexpression einiger Ethylenrezeptoren sowie Singalproteine als Parameter des Ethylenreaktionsweges gemessen. Da die Fruchtfleischfestigkeit hauptsächlich durch den Aufbau der Zellwand bedingt ist, werden als weitere reiferelevante Parameter die Aktivität und Genexpression einiger zellwandmodifizierender Proteine gemessen sowie anhand histologischer Schnitte der zelluläre Zustand nach Beendigung der Lagerung betrachtet. Die Bestimmung dieser reiferelevanten Parameter wird herangezogen, um zum einen die Unterschiede zwischen weichenwerdenden und festbleiben Sorten zu erfassen und zum anderen die Abhängigkeit zum Reifungshormon Ethylen festzustellen. Dabei sollen folgende Arbeitshypothesen überprüft werden, die detailliert in Tabelle 1 für die einzelnen Parameter wiedergegeben sind:

- Die reiferelevanten Parameter verändern sich in den weichwerdenden Apfelsorten früher bzw. stärker als in festbleibenden Sorten, weil jene ethylensensitiv sind.
- Die Unterbrechung der reifebedingten Prozesse in der Apfelfrucht durch 1-MCP erfolgt bis zu 7 Tage nach der Ernte und ist abhängig von der Ethylensensitivität der Apfelsorte.
- Die Zugabe von exogenem Ethylen bewirkt bei ethylensensitiven Sorten unmittelbar nach der Behandlung eine drastische Veränderung der reiferelevanten Parameter und verkürzt die reifehemmende Wirkung durch 1-MCP unabhängig von der Ethylensensitivität.

Tabelle1: ErwartetesVerhaltenderreiferelevantenParameterFruchtfleischfestigkeit,
Ethylenproduktion, Enzymaktivität und Genexpression einerApfelfrucht im zeitlichen
Verlauf nach der Ernte, im Unterschied zwischen weichwerdenden (weich) und
festbleibenden (fest)Apfelsorten sowie der Vergleich einer Behandlung mit
1-Methylcyclopropen (1-MCP) oder Ethylen zu einer Nichtbehandlung. ↓= nimmt ab/ist
geringer; ↑= steigt an/ ist höher; —= ist unverändert/besteht kein Unterschied.

Reiferelevante Parameter		Zeitl. Sorte		Behandlung		
		Verlauf	weich	fest	1-MCP	Ethylen
	Fruchtfleisch- festigkeit	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\uparrow	\downarrow
Aktivität der	Ethylen- produktion	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\downarrow	\uparrow
Ethylenblosynthese-Enzyme.	ACS	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow
	ACO	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow
Consumption day	ACO1	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow
Genexpression der	ACS1	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow
Ethylenblosynthese-Enzyme:	ACS3	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\uparrow	—
	ETR1	_	_	_	_	_
Genexpression der	ETR2	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow
Ethylenrezeptoren:	ERS1	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\uparrow
, ,	ERS2	\checkmark	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow
Geneypression der	CTR1	_	_	_	_	_
Ethylensignalproteine:	FRF1	J	$\mathbf{\Lambda}$	J	J	$\mathbf{\Lambda}$
		¥		¥	¥	1
Aktivität pektin-	PME	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	_
modifizierender Enzyme:	GAL	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\checkmark	\uparrow
	PG	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\checkmark	\uparrow
Genexpression	PL	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\checkmark	\uparrow
pektinmodifizierender	GAL	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\checkmark	\uparrow
Proteine:	AF1	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\checkmark	\uparrow
	PME	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\downarrow	\uparrow
	FYD7	$\mathbf{\Lambda}$	$\mathbf{\Lambda}$.1.	.1.	$\mathbf{\Lambda}$
Genexpression		」 个	」 个	.↓.		」 个
hemizellulose- und zellulosemodifizierender Proteine:			」	V I	V I	」
				¥ I	₩ 1	
		·]·		\mathbf{v}	\mathbf{v}	
	EGase	.1.	.1.	\mathbf{V}	\checkmark	.1.
	Anzahl Cortexzellen	\downarrow	\checkmark	\uparrow	_	_
histologie.	Anzahl Interzellularen	\uparrow	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsstandort und Pflanzmaterial

Die Versuche zur sortenspezifischen Fruchtfleischfestigkeitsabnahme beim Apfel (*Malus domestica × BORKH*) wurden am Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (KOB) bei Ravensburg, Deutschland, unter kommerziellen Anbaubedingungen in den Jahren 2012 bis 2014 durchgeführt. Als Versuchssorten dienten im Versuchsjahr 2012/13 die Sorten ,Elstar' (Mutante Red Elstar) und ,Pinova' und im Versuchsjahr 2013/14 zusätzlich die Sorte ,Golden Delicious' (Mutante Reinders). Alle Sorten waren auf der Unterlage M9 veredelt, wurden als Schlanke Spindel erzogen und zwischen 2002 und 2003 gepflanzt. Die Sorten wurden so gewählt, dass unterschiedliche Festigkeitstypen und Ethylenproduzenten verglichen werden können (Kittemann, 2012): ,Elstar' und ,Golden Delicious' gelten als weichwerdende Sorten und ,Pinova' als festbleibende Sorte sowie ,Elstar' und ,Pinova' als niedrige Ethylenproduzenten und ,Golden Delicious` als hoher Ethylenproduzent. Aufgrund dieser Sorteneigenschaften wurde vermutet, dass jede dieser Sorten einer Kategorie des Weichwerdens entspricht: ,Golden Delicious' der Kategorie 1, ,Elstar' der Kategorie 2 und ,Pinova' der Kategorie 3.

3.2 Versuchsaufbau

Ernte

Zur Festlegung des Erntezeitpunktes der Früchte wurde den Empfehlungen des Beratungsservices am KOB gefolgt. Für die Versuche wurden die Früchte in beiden Versuchsjahren zu zwei Zeitpunkten geerntet, um unterschiedliche Reifegrade und somit unterschiedliche Abnahmeraten in der Fruchtfleischfestigkeit zu erfassen. Das empfohlene Erntefenster für "Elstar' liegt bei einem Streif-Index (SI)-Wert von 0,30 bis 0,15, für "Pinova' von 0,16 bis 0,08 und für "Golden Delicious' von 0,10 bis 0,05. Im Versuchsjahr 2012/13 wurde der Beginn des Erntefensters der jeweiligen Sorte als früher Erntetermin gewählt. Der späte Erntetermin wurde auf 14 Tage nach dem ersten Termin festgelegt. Im Versuchsjahr 2013/14 wurde der mittlere Bereich des Erntefensters der jeweiligen Sorte als mittlerer Erntetermin gewählt. Der späte Erntetermin wurde auf 7 Tage nach dem ersten Termin gesetzt (Tabelle 2). Zu jedem Erntezeitpunkt wurden so viele Bäume einer Sorte verwendet, bis die benötigte Anzahl an Früchten erreicht war. Dies waren je Sorte und Erntezeitpunkt inklusive 10 % Reservefrüchte für das Versuchsjahr 2012/13 1815 und für das Versuchsjahr 2013/14 726 Früchte. Dabei wurden die Früchte nach den Vorgaben der Handelsklasse 1 geerntet.

Conto	Versuchsjahr 2	012/13	Versuchsjahr 20	Versuchsjahr 2013/14		
Sorte	Tag der Ernte	SI	Tag der Ernte	SI		
,Elstar´	03.09.2012	0,27	16.09.2013	0,34		
	17.09.2012	0,12	23.09.2013	0,31		
(19.09.2012	0,19	01.10.2013	0,19		
,Pinova	02.10.2012	0,08	09.10.2013	0,09		
,Golden Delicious′	-	-	08.10.2013	0,07		
	-	-	15.10.2013	0,07		

 Tabelle 2: Übersicht des Erntezeitpunktes und des zugehörigen Streif-Index (SI) der Versuchsjahre

 2012/13 und 2013/14 für die Sorten ,Elstar´, ,Pinova´ und ,Golden Delicious´.

Lagerung

Im Anschluss an die Ernte wurden die Früchte in einen Kühlraum mit Mantelkühlung gebracht, der 12 gasdichte Versuchszellen (0,574 m³) enthält. Jede der Versuchszellen verfügt über eine regelbare Gaszufuhr und wurde permanent mit Frischluft (975 ±25 ml*min⁻¹) gespült, um die Fruchtethylenanreicherung innerhalb der Versuchszelle zu unterbinden. Die zur Spülung der Versuchszellen verwendete Luft wurde außerhalb des Kühlraums in die Atmosphäre entlassen. Die Früchte wurden bei Normalatmosphäre und 10 °C gelagert, um den Reifeverlauf im Vergleich zu einer kommerziellen Kühllagerung (1±0,5 °C) oder einer Lagerung bei Raumtemperatur (RT; 22±2 °C) moderat zu hemmen. Als zusätzliche Kontrolle der Temperatur des Kühlraums wurde die Fruchttemperatur mit einem Flüssigkeitsglasthermometer (Jumo, Deutschland) erfasst. Die Lagerdauer betrug im Versuchsjahr 2012/13 drei Monate und wurde im Versuchsjahr 2013/14 auf 4 Monate verlängert, weil die zuerst gewählte Lagerdauer nicht ausreichte, um den Beginn der Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit bzw. Ethylenproduktion der Sorten zu erfassen.

Behandlung

Die Behandlung mit dem Reifeinhibitor 1-Methylcyclopropen (1-MCP) (1-Methylcyclopropen für die Forschung (AF*RD 0,014% Mischung mit D-Glucose 99,4-99,8%; α-Cyclodextrin 0,19-0,59%), AgroFesh, Deutschland) erfolgte in einer Versuchszelle, deren Frischluftzufuhr für 24 h unterbrochen und deren Luftzugang und –ausgang verschlossen wurden. Die in dieser Versuchszelle gelagerten Früchte wurden mit 870 ppm 1-MCP behandelt. Im Versuchsjahr 2012/13 wurden zwei einmalige Behandlungen mit 7 Tagen Unterschied durchgeführt, um einen fortgeschrittenen Reifevorgang unterbrechen zu können. Im Versuchsjahr 2013/14 erfolgte aufgrund der Ergebnisse des Vorjahres nur eine einmalige Behandlung der Früchte (Tabelle 3, Abbildung 7).

Die Behandlung mit dem Reifepromotor Ethylen (Lenogan®96, Sauerstoffwerk Friedrichshafen, Deutschland) erfolgte über die Frischluftzufuhr der Versuchszelle. Dazu wurde der Frischluft Ethylen beigemengt, so dass eine Ethylenkonzentration von 175 ±25 ppm in der Versuchszelle gewährleistet war, um eine physiologisch wirksame Ethylendosis mit Sicherheit zu erreichen (Johnston *et al.*, 2009). Dabei wurde die permanente Ethylenzufuhr des Versuchsjahres 2012/13 im Versuchsjahr 2013/14 in eine Ethylenzufuhr in Intervallen von jeweils 48 h gewandelt, um die Reife immer wieder zu stimulieren (Tabelle 3, Abbildung 7).

Versuchs- jahr	Behandlung	Bezeichnung	Zeitpunkt der 1-MCP-Behandlung [Tag der Lagerdauer]	Zeitpunkte der Ethylen-Behandlung [Tag der Lagerdauer]
2012/13	Unbehandelte Kontrolle	К	-	-
	1-MCP	M0	0	-
	1-MCP	M7	7	-
	1-MCP + Ethylen	M0+E9	0	9-88
	1-MCP + Ethylen	M7+E9	7	9-88
	Ethylen	E9	-	9-88
	Unbehandelte Kontrolle	К	-	-
2013/14	1-MCP + Ethylen	M1+E3	1	3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 für jeweils 48 h
	Ethylen	E3	-	3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98 für jeweils 48 h

 Tabelle 3: Varianten der Behandlung der Versuchsjahre 2012/13 und 2013/14 mit den Zeitpunkten der 1-Methylcyclopropen (1-MCP)- und Ethylen-Behandlung.

Probennahmen

Für die Entnahme von Fruchtproben wurden die Versuchszellen nacheinander geöffnet, die benötigte Anzahl an Früchte entnommen und die Versuchszellen wieder verschlossen. Dabei wurden die zusätzlich mit Ethylen durchspülten Versuchszellen zuletzt geöffnet, damit die nicht mit Ethylen versetzten Früchte keine Ethylenkontamination erhielten. Im Versuchsjahr 2012/13 wurden alle Früchte vor der Analyse an die Raumtemperatur (RT; 22±2 °C) über 7 h (±1) akklimatisiert. Die erste Probennahme (1. PN) erfolgte am Tag des Lagerbeginns, die nächsten 4 Probennahmen unmittelbar vor und zwei Tage nach einer Behandlung (2.-5. PN), sowie 6 weitere ab dem 18. Tag der Lagerdauer in 14-tägigem Abstand (6.-11. PN). Im Versuchsjahr 2013/14 wurden die Früchte vor der Analyse nicht akklimatisiert, um eine Erwärmung der Frucht und damit einen Anschub der enzymatischen Aktivität zu verhindern. Die erste Probennahme erfolgte am Tag des Lagerbeginns (1. PN), die nächsten 4 ab dem 7. 20
Tag der Lagerdauer in 7-tägigem Abstand (2.-5. PN) und sechs weitere ab dem 28. Tag der Lagerdauer in 14-tägigem Abstand (6.-11. PN) (Abbildung 7).



Abbildung 7: Darstellung der Zeitpunkte einer Fruchtprobennahme (PN) und einer 1-Methylcyclopropen (1-MCP)-Behandlung (★) sowie der Beginn und die Dauer der Ethylenbehandlung (→) in den Versuchsjahren 2012/13 und 2013/14.

3.3. Fruchtfleischfestigkeit

Die Messung der Fruchtfleischfestigkeit erfolgte in beiden Versuchsjahren zu allen Probennahmen (1.-11. PN). Dazu wurden im Versuchsjahr 2012/13 in 3 Wiederholung je 8 Früchte und im Versuchsjahr 2013/14 in 3 Wiederholung je 7 Früchte verwendet. Die Fruchtfleischfestigkeit wurde nach Entfernung der Schale mit einem halbautomatischen Penetrometer (Fruit Texture Analyzer, Fa. Guss, Südafrika) am Übergang zwischen Schattenund Sonnenseite gemessen. Dazu wurde die Kraft [N] gemessen, die notwendig ist um den Stempel (Ø 11 mm²) des Penetrometers 8 mm tief ins Fruchtfleisch zu führen. Im Anschluss an diese Messung wurden die Früchte zur weiteren Probenmaterialgewinnung verwendet (Abbildung 8, Tabelle 4).



- Abbildung 8: Ablauf der Gewinnung des Probenmaterials von einer Frucht. Im ersten Schritt wurde die Fruchtfleischfestigkeit in der Äquatorialebene beim Übergang von Sonnen- zu Schattenseite mit einem Penetrometer gemessen nach Entfernung der Schale (⊕). Im zweiten Schritt wurde die Schale um die Äquatorialebene für die Bestimmung der ACO-Aktivität und der Genexpression verwendet. Im dritten Schritt wurde die Äquatorialebene herausgeschnitten und das Fruchtfleisch der Sonnen- und Schattenseite für die Bestimmung der ACS- und GAL-Aktivität sowie ebenfalls zur Genexpression benutzt. Gegenüber der Messstelle der Fruchtfleischfestigkeit wurde ein Stück Fruchtfleisch für die Histologie herausgeschnitten (⊞).
- Tabelle 4: Übersicht der Parameter, deren Probenmaterial an derselben Fruchtanzahl einer Wiederholung gewonnen wurde, und die Zeitpunkte einer Probennahme (PN), zu dem die Messung stattgefunden hat.

Parameter	Messung an	Probenmaterial	PN 2012/13	PN 2013/14
Fruchtfleischfestigkeit	Einzelfrucht	Frucht	1-11	1-11
ACO-Aktivität	Mischprobe	Schale	1-11	1-11
ACS-Aktivität	Mischprobe	Fruchtfleisch	1,5,8,11	1-11
PME-Aktivität	Mischprobe	Fruchtfleisch	1-11	-
GAL-Aktivität	Mischprobe	Fruchtfleisch	-	1-11
Histologie	Einzelfrucht	Fruchtfleisch	11	-
Genexpression	Mischprobe	Fruchtfleisch+Schale	-	1,4,6

3.4 Ethylenbiosynthese

Ethylenproduktion

Die Messung der Ethylenproduktion fand in beiden Versuchsjahren zu jeder Probennahme statt (1.-11. PN). Für die Messung wurden jeweils 3 Früchte (Gesamtgewicht von 475±25g) in 3 Wiederholungen pro Behandlungsvariante in einem gasdichten 31 Gefäß eingeschlossen, damit sich das Fruchtethylen akkumulieren konnte. Im Versuchsjahr 2012/13 wurden für jede Messung neue Früchte verwendet, während im Versuchsjahr 2013/14 die Früchte markiert und bei jeder Messung dieselben Früchte verwendet wurden. Nach einer Akkumulierungszeit von 2 h bei 20 °C im Versuchsjahr 2012/13 und von 4 h bei 10 °C im Versuchsjahr 2013/14 wurde eine Probe aus dem Gasraum des Gefäßes entnommen und 1 ml davon im Gaschromatographen(GC) Series 2150, Carlo Erba, (Fractovap Italien; 22

Flammenionisationsdetektor (175 °C); Edelstahlsäule, 0,9 m x 1/8 Zoll (100 °C); Füllung: aktiviertes Aluminiumoxid, 60 mesh; Trägergas: Stickstoff) quantifiziert. Die Berechnung der Ethylenproduktion erfolgte mit Hilfe eines definierten Standards einer bekannten Ethylenkonzentration nach der Formel 3:

$$Ethylenproduktion \left[\mu l C_2 H_4 * kg^{-1} * h^{-1}\right] = \frac{\left(Messgefäß \left[l\right] - \left(\frac{Einwaage \left[kg\right]}{Apfeldichte \left[\frac{kg}{l}\right]}\right)\right) * Ethylenkonzentration \left[ppm\right]}{Einwaage \left[kg\right] * Akkumulierungszeit [h]},$$
(2)

ACO-Aktivität

Die Messung der ACC-Oxidase (ACO)-Aktivität wurde in beiden Versuchsjahren zu allen Probennahmen (1.-11. PN) vorgenommen (Tabelle 4). Zur Durchführung wurde die Methode nach Bufler (1986) verwendet. Das Probenmaterial bestand aus einer Mischprobe der Fruchtschalen aus der Äquatorialzone von 8 (Versuchsjahr 2012/13) bzw. 7 (Versuchsjahr 2013/14) Früchten jeder Behandlungsvariante in dreifacher Wiederholung (Abbildung 8). Aus den Schalen wurden gleich große Stücke mit einem Gesamtgewicht von 3 g ausgestanzt. Die Stücke wurden mit der Schalenoberseite in eine zu gleichen Teilen aus Puffer (10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) 6) und Substrat pН (0,1 mM 1-Aminocyclopropancarboxylsäure (ACC)) bestehenden Lösung getaucht und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Stücke trocken getupft und in ein mit einem Septumverschlossenes 50 ml Gefäß mit 2 % CO₂ für 35±5 min bei RT nochmals inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde eine 1 ml-Gasprobe aus dem Gasraum des Inkubationsgefäßes gezogen und die enthaltene Menge an Ethylen im GC quantifiziert. Die Berechnung der ACO-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines definierten Standards einer bekannten Ethylenkonzentration nach der Formel 4:

$$ACO - Aktivität [nl C_2H_4 * g^{-1} * h^{-1}] = \frac{\left(Inkubationsgefäß [ml] - \left(\frac{Einwaage [g]}{Apfeldichte \left[\frac{g}{ml}\right]}\right)\right) * Ethylenkonzentration [ppm]}{Einwaage [g] * Reaktionszeit [h]}.$$
(3)

ACS-Aktivität

Die Messung der ACC-Synthase (ACS)-Aktivität wurde im Versuchsjahr 2012/13 zu den Probennahmen 1, 5, 8 und 11 durchgeführt, um einen Überblick der ACS-Aktivität im Verlauf der Lagerdauer zu erhalten. Im Versuchsjahr 2013/14 wurde die ACS-Aktivität zu allen Probennahmen (1.-11. PN) gemessen (Tabelle 4). Hierfür wurde die Methode nach Bulens *et al.* (2011) verwendet. Das Probenmaterial bestand aus einer Mischprobe des Fruchtfleisches aus der Äquatorialebene von 8 (Versuchsjahr 2012/13) bzw. 7 (Versuchsjahr 2013/14)

Früchten jeder Behandlungsvariante in dreifacher Wiederholung (Abbildung 8). Das Fruchtfleisch wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemahlen und von dieser homogenisierten Probe 3 g mit 15 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP) und 3 ml kalter Extraktionslösung gemischt. Die Extraktionslösung wurde täglich aus 150 µl 2 mM Pyrodoxal-L-Phosphat (PLP) + 115,5 mg Dithiotreithol (DTT) + 75 ml 200 mM Tricin pH 8,5 angesetzt. Nach der Homogenisation wurden die Proben zentrifugiert (20 min, 4 °C, 24,414 g), der Überstand abgenommen, gefiltert (Miracloth, VWR, USA) und in Eis aufbewahrt. Bei 4 °C wurden Sephadexsäulen G-25 (Disposable PD 10 Desalting Columns, GE Healthcare, Deutschland) mit 10 ml kalter Säulenlösung equilibriert, die täglich aus 405 µl 2 mM PLP + 62,6 mg DTT + 405 ml 5 mM Tricin pH 8,0 angesetzt wurde. Für die Aufreinigung der Probe wurden 2,5 ml des Probenüberstandes auf eine Sephadexsäule gegeben und der Durchfluss verworfen. Die Proteinfraktion wurden dann mit 3,5 ml Säulenlösung eluiert und zwei 1,5 ml Aliqoute bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Aufbereitung wurden die Proben aufgetaut und mit Substratlösung (150 µl 200 mM Tricin pH 8,5 und 150 μl 1,2 mM S-(5'-Adenosyl)-L-Methionin-Chlorid (SAM)) versetzt und für 2 h im Wasserbad unter Rotation bei 25 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl 100 mM HgCl₂ je Probe gestoppt und die Proben auf Eis gestellt oder für eine spätere Messung bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der ACS-Aktivität beruht auf der Quantifizierung von Ethylen im GC, welches durch die chemische Umsetzung von ACC durch eine Natriumhydroxyd-Natriumhypochlorithaltige Reaktionslösung entsteht. Die gemessene Ethylenkonzentration einer Probe mit unbekannter und bekannter ACC-Konzentration wird dann mit der Formel 5 verrechnet. Die Proben wurden nach gestoppter Enzymaktivität in zwei 950 µl Aliquote geteilt und mit jeweils 850 µl dest. Wasser gemischt. Eines der beiden Aliquote jeder Probe wurde zudem als Positivprobe mit 20 µl 50 µM ACC versetzt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle (900 µl dest. Wasser + 100 µl 100 mM HgCl₂) in dreifacher Wiederholung hergestellt, die analog mit 850 µl dest. Wasser und 20 µl 50 µM ACC gemischt wurde. Alle Proben wurden in 20 ml Schnappdeckelgläser angesetzt und mit einer Membran verschlossen. Jeder Proben wurde nacheinander mit einer 1 ml Spritze 200 µl kalte Reaktionslösung (5 % NaOCl-6 M NaOH-Mischung (2:1, v/v); täglich hergestellt) injiziert und die Probe auf Eis inkubiert. Nach 4 min wurde die Probe für 5 s geschüttelt, um alles Ethylen in den Gasraum des Schnappdeckelglases zu entlassen. Unmittelbar danach wurde eine 1 ml-Probe aus diesem Gasraum entnommen und im GC quantifiziert.

 $ACS - Aktivität \ [mol * kgFW^{-1} * s^{-1}] = \frac{\eta_{Probe} \ [mol] * V_{Extrakt} \ [m^3] * D_{Saule} * D_{Messung} * 10^9}{Eff * V_{Inkubation} \ [m^3] * w \ [g] * t \ [h] * 3,6}, \qquad (4)$ wobei die Verdünnungsfaktoren D_{Saule} und D_{Messung} mit 1,4 bzw. 1,33 wiedergeben werden, w für die Einwaage, t für die Inkubationszeit und V_{Extrakt} für das Volumen des Extraktes nach der Zentrifugation sowie V_{Inkubation} für das eingesetzte Volumen des gereinigten Extraktes für die Inkubation steht. Die Umsatzrate η_{Probe} wird mit der Formel 5.1 und die Reaktionseffizienz Eff mit der Formel 5.2 berechnet:

$$\eta_{Probe}[mol] = \frac{Eth_{Probe}[ppm]*10^{-6}*p_i[Pa]*V_{Probe}[m^3]}{R[J*mol^{-1}*K^{-1}]*T[K]},$$
(4.1.)

wobei Eth_{Probe} für die gemessene Ethylenkonzentration der Probe, p_i für den Luftdruck mit 10132 Pa, V_{Probe} für das Volumen des Messgefäßes weniger der Messlösung der Probe, R für die universelle Gaskonstante mit 8,314 $J * mol^{-1} * K^{-1}$ und T für die Temperatur mit 273 K steht.

$$Eff = \frac{\eta_{Positivprobe} [mol] - \eta_{Probe} [mol]}{\eta_{Positivkontrolle} [mol]},$$
(4.2)

wobei $\eta_{Positivprobe}$ und $\eta_{Positivkontrolle}$ nach den Formeln 5.3 und 5.4 berechnet werden:

$$\eta_{Positivprobe}[mol] = \frac{Eth_{Positivrobe}[ppm]*10^{-6}*p_i[Pa]*V_{Positivrobe}[m^3]}{R[J*mol^{-1}*K^{-1}]*T[K]},$$
(4.3)

wobei $Eth_{Positivprobe}$ für die gemessene Ethylenkonzentration der Positivprobe und $V_{Positivprobe}$ für das Volumen des Messgefäßes weniger der Messlösung der Positivprobe steht.

$$\eta_{Positivkontrolle}[mol] = \frac{Eth_{Positivkontrolle} [ppm] * 10^{-6} * p_i [Pa] * V_{Positivkontrolle} [m^3]}{R [J * mol^{-1} * K^{-1}] * T [K]},$$
(4.4)

wobei Eth_{Positivkontrolle} für die gemessene Ethylenkonzentration der Positivkontrolle und V_{Positivkontrolle} für das Volumen des Messgefäßes weniger Messlösung der Positivkontrolle steht.

3.5. Histologie

Die Bestimmung der Anzahl der Cortexzellen und Interzellularen je Flächeneinheit wurde im Versuchsjahr 2012/13 zur 11. Probennahme durchgeführt (Tabelle 4). Das Probenmaterial bestand aus Fruchtfleischstücken (1 cm²) aus der Äquatorialebene von 8 Einzelfrüchte je Behandlungsvariante in dreifacher Wiederholung (Abbildung 8).

Fixierung

Zur Fixierung der Proben wurden diese mit einem Tropfen Tween 80 in die Fixierlösung (50 ml 0,2 M Phosphat-Puffer pH 7,2 + 20 ml 10 % Paraformaldehyd +2 ml 50 % Glutaraldehyd + 28 ml dest. Wasser + 1 g Coffein) gelegt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei RT unter Vakuum gesetzt, damit die Fixierlösung in die luftgefüllten Räume der Fruchtfleischproben eindringen konnte. Die Proben lagerten daraufhin für 48 h bei 5±1 °C. Danach wurde die

Fixierlösung entfernt, die Proben für 1 h in 50 % Ethanol (EtOH) gelegt und anschließend in 70 % EtOH bei 5±1 °C gelagert. Die nachfolgenden Arbeiten wurden am Plate-forme d'Histocytologie et d'Imagerie Cellulaire végétale (PHIV) in Montpellier, Frankreich, durchgeführt.

Einbettung

Für die Einbettung in Harz wurden je 3 Probenstücke einer Wiederholung verwendet, von denen jeweils 3 technischen Wiederholungen angefertigt wurden. Die Probenstücke wurden für die Einbettung in einem Mikrowellenherd zur Verarbeitung von histologischen Gewebeproben (Histos 5, Milestone, Italien) automatisch vorbereitet, indem die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 % EtOH für 5 min, 90 % EtOH für 7 min, 100 % EtOH für 7 min) erst entwässert wurden, um anschließend das Harz über ein Gemisch mit Butanol (100 % EtOH/Butanol (1:1) für 7 min, Butanol für 12 min, Butanol/Harz (1:1) für 17 min, Harz für 90 min) in das Gewebe infiltrieren zu können. Im Anschluss an die Harz-Infiltration folgte die Einbettung in Harz manuell (Technovit 7100, Fa. Heraeus Kulzer Technik, Deutschland). Die Proben wurden am Mikrotom (RM 2255, Leica Biosystems, Deutschland) in 5 μm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger gebracht.

Färbung und Dokumentation

Die Schnitte wurden mit Periodsäure Schiff´sche Reagenz (PAS) gefärbt. Dafür wurden die Objektträger für 5 min bei Raumtemperatur in 1 %-Periodsäure gelegt. Anschließend wurden sie mit dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Danach wurden die Objektträger im Dunkeln für 10 min in Schiff´sche Reagenz gelegt. Im Anschluss wurden die Proben mit dest. Wasser gewaschen, bis das Wasser klar blieb. Danach wurden die Proben getrocknet und mit Deckgläschen und Eindeckmittel (Isomount, VWR, USA) konserviert. Die gefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (DM4500B, Leica Biosystems, Deutschland) bei 5-facher Vergrößerungen mit einer Kamera (Retiga 2000R, QImaging, Kanada) fotografiert und der Software Volocity 6.0 bearbeitet.

Auswertung

Für die Bestimmung der Anzahl der Zellen und Interzellularräume wurde mit der OpenSource Software ImageJ (Version 1.47v) der Maßstab in das Bild eingetragen, anhand des Maßstabes ein Quadrat mit der Fläche 1 mm² entworfen und über das Bild gelegt. Die in dem enthaltenen Quadrat gelegenen Zellen und Interzellularräume wurden manuell gezählt und so die Anzahl Zellen bzw. Interzellularräume je mm² erfasst.

3.6. Aktivität zellwandmodifizierender Enzyme

Die Bestimmung der Aktivität der zellwandmodifizierenden Enzyme Pektinmethyleesterase (PME) erfolgte im Versuchsjahr 2012/13 und β -Galaktosidase (GAL) im Versuchsjahr 2013/14 zu jeder Probennahme (1.-11. PN) (Tabelle 4). Das Probenmaterial bestand aus einer Mischprobe des Fruchtfleisches aus der Äquatorialebene von 8 (Versuchsjahr 2012/13) bzw. 7 (Versuchsjahr 2013/14) Früchten jeder Behandlungsvariante in dreifacher Wiederholung (Abbildung 8). Das Probenmaterial wurde gefriergetrocknet und gemahlen. Zur Durchführung wurden die Methoden nach Kittemann (2012) mit den nachfolgenden Anpassungen durchgeführt.

PME-Aktivität

100 mg pulverisiertes Probenmaterial wurde mit 1000 µl kaltem Extraktionspuffer (2 ml 1M Tris-HCl pH 7,0 + 4 ml 0,5 M Cystein-HCl + 4 ml 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) + 50 µl Tween 80 in 100 ml dest. Wasser) gemischt und kurz homogenisiert. Zur Verbesserung der Enzymextraktion wurden die Probe für 20 min auf Eis geschüttelt, anschließend zentrifugiert (10 min, 4 °C, 13000 rpm) (Heraeus Biofuge fresco, Thermo Fisher Scientific, USA) und der Überstand, der den Enzymextrakt darstellt, aufbewahrt. Das Pellet wurde noch zweimal mit Extraktionslösung versetzt, auf Eis geschüttelt, zentrifugiert und die Überstände vereint. Ein 1 ml Aliquot des Enzymextraktes wurde bei 4 °C über eine Sephadexsäule G-25 gereinigt. Hierzu wurde die Säule zuvor mit 20 ml Säulenpuffer (200mM Tris-HCl pH 7,0) equilibriert. Dann wurde das Probenaliquot aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Zur Probeneluierung wurde die Säule zweimal mit 2 ml Säulenpuffer versetzt. Der erste Durchfluss wurde verworfen und der zweite Durchfluss, in dem das Enzym enthalten ist, aufgefangen.

Die photometrische Bestimmung der PME-Aktivität beruht auf der Abnahme des pH-Wertes mit einhergehendem Farbumschlag einer Indikatorlösung infolge der enzymatischen Abspaltung der Methylgruppen vom Homogalakturonan (HG) der Substratlösung. Für die Messung wurden 200 µl Indikatorlösung (5 mg Bromthymolblau (BTB) + 290 mg NaCl + 100 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5 in 50 ml dest. Wasser) mit 800 µl Substratlösung (0,5 % (w/v) Apfel-Pektin pH 7,5) in einer Küvette (Halbmikro 1,5 ml PMMA, Brand, Deutschland) gemischt und anschließend 100 µl Enzymextrakt zugegeben. In der Negativkontrolle wurde der Enzymextrakt durch Säulenpuffer ersetzt. Die Proben wurden bei 28 °C für 5 h schüttelnd inkubiert. Die Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm (U2001, Scientific Instruments, Deutschland), wobei die Werte der Enzymextrakte in Relation zum Wert der Negativkontrolle gemessen und das Ergebnis als Δ Absorbanz*100 mg⁻¹ Trockensubstanz*h⁻¹ angegeben wurde. Bei wiederholter Messung der Proben nach 0, 20 und 40 min zeigten sich jedes Mal andere Messwerte der Negativkontrolle sowie der Enzymextrakte. Bei einer

27

Langzeitmessung der Negativkontrolle zeigte sich die Veränderung der Absorbanz deutlich (Abbildung 9), was bedeutete, dass die Messlösung nicht stabil geblieben und somit die Verlässlichkeit der Messung nicht sichergestellt war. Der Verlauf der Absorbanzmessung deutet daraufhin, dass sich die Substratlösung im basischen Milieu zersetzt (Krall & McFeeters, 1998) und dies die pH-Wertveränderung verursacht, die durch die Indikatorlösung am Photometer messbar ist. Nachfolgend wurde in mehreren Ansätzen (Tabelle 5) im Rahmen einer Bachelor-Arbeit versucht, die einzelnen Schritte der Messung der PME-Aktivität zu optimieren. Hierfür musste zunächst eine stabile, parallel zur Zeitachse verlaufende Linie der Absorbanzwerte der Negativkontrolle erhalten werden (1.), anschließend musste eine geeignete Positivkontrolle etabliert werden (2.) und zuletzt ein Extraktionsverfahren entwickelt werden, um ausreichend natives Enzym aus dem Probenmaterial zu gewinnen (3.).



Abbildung 9: Photometrische Messung der Negativkontrolle der PME-Aktivität nach Kittemann (2012) bei einer Absorbanz von 620 nm.

Die ursprünglich auf Hagerman & Austin (1986) zurückgehende Methode wurde seither mit Variationen bei verschiedenen Kulturpflanzen zur photometrischen PME-Messung angewendet (Alonso *et al.*, 1997; Lohani *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2005; Goulao *et al.*, 2007; Hyodo *et al.*, 2013). Die Variationen bestanden hauptsächlich in der Art der Gewebeextraktion, da diese sich hinsichtlich der Fruchtmorphologie und verschiedener Inhaltsstoffe, wie Phenol- und Zuckergehalt, unterschieden. Weitere Variationen lagen in der pH-Werteinstellung der Komponenten der Messlösung, die grundlegend aus Pektin, BTB, Wasser und Enzymextrakt bestand. Entsprechend wurden zur Prüfung der Verlässlichkeit der photometrischen Messung der PME-Aktivität diejenigen Variationen zwischen den Protokollen übernommen, die den pH-Wert betreffen. Des Weiteren wurde die von Hagerman & Austin (1986) empfohlene Verwendung des Farbindikators Bromkresolgrün (BKG) und das Enzym Pectinesterase (Sigma-Aldrich, USA) als Positivkontrolle geprüft. Dabei wurde die gefriergetrocknete Pectinesterase als wässrige Stammlösung angesetzt. BKG wurde als alternativer Indikator verwendet, dessen Farbumschlag im niedrigeren pH-Bereich (3,8 bis 5,4) als BTB (5,8 bis 7,6) liegt. So wurde jeder Ansatz einmal im basischen Bereich mit BTB und einmal im sauren Bereich mit BGK als Farbindikator durchgeführt.

Schritt	Ansatz	Untersuchte Variable	Variante der untersuchten Variablen	Quelle
	1.1	Konzentration der Indikatoren	0,01; 0,05; 0,1 %	
4	1.2a	Komponentenlösung pH-eingestellt	Substrat	Lohani <i>et al.,</i> 2004
Negativ- kontrolle	1.2b		Indikator + Probe	Vicente <i>et al.,</i> 2005
Kontrone	1.3a	Komponenten in Puffer gelöst	Substrat	Hagerman &
	1.3b		Substrat + Indikator Probe	Austin, 1986
2.1		Verdünnungslösung des Enzyms	dest. Wasser; Puffer	Hagerman &
kontrolle	2.2	Konzentration des Enzyms	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 U	Austin, 1986
	3.1	Zustand des Materials	gefroren; gefriergetrocknet	Lohani <i>et al.,</i> 2004; Kittemann, 2012
3.	3.2a	Extraktionslösung	10 M NaCl, 10 g*l ⁻¹ PVPP	Vicente <i>et al.,</i> 2005
Extraktion	3.2b		20 mM Tris-HCl pH 7, 20 mM Cystein-HCl, 20 mM EDTA, 0,05 % Tween 80 [*]	Lohani <i>et al.,</i> 2004
	3.3	Mehrfach Extraktion	3*0,5 ml; 1*1,5 ml	Kittemann.
	3.4	Aufreinigung des Extraktes	mit/ ohne Sephadexsäule G-25	2012

Tabelle 5: Übersicht der verschiedenen Ansätze, um die Verlässlichkeit der photometrischen Messung der PME-Aktivität zu validieren.

^{*} Im Original wurde Triton X-100 verwendet

Um die verschiedenen Variationen miteinander vergleichen zu können, wurden die Komponenten zur Messung unabhängig von den Originalprotokollen folgendermaßen standardisiert: Die Substratlösung wurde für alle Messungen mit einer Konzentration von 0,5 % (w/v) Apfel-Pektin hergestellt. Für den Ansatz 1.1 der Einstellung der Konzentration der Indikatoren (Tabelle 5) wurden ein 200 mM Natriumphosphat-Puffer (NPP) für die Kombination mit BTB mit dem pH-Bereich von 5,7 bis 7,7 und für die Kombination mit BKG ein 200 mM Essigsäure-Natriumacetat-Puffer (ENAP) mit dem pH-Bereich von 3,7 bis 5,5 verwendet, um den Absorbanzwert bei den jeweiligen Umschlagpunkten der Indikatoren (BTB: 5,8/ 6,7/ 7,6; BKG: 3,8/ 4,6/ 5,4) zu ermitteln. Für den Ansatz 1.3 der Lösung einzelner

Komponenten in Puffer (Tabelle 5) wurde NPP pH 7,6 und ein ENAP pH 5,5 gewählt. In Anlehnung an die Puffer der Extraktion wurde für den Ansatz 1.3c ebenfalls ein 200 mM Tris-HCI-Puffer pH 7 für die Kombination mit BTB und ein 200 mM MES-Puffer pH 5,8 für die Kombination mit BKG genutzt. Diese Puffer wurden auch für den Ansatz 2.1 (Tabelle 5) als Verdünnungslösung der Enzymstammlösung verwendet. Die Indikatoren BTB und BKG wurden trotz der besseren Löslichkeit in Ethanol in dest. Wasser oder Pufferlösung angesetzt, um eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch Ethanol zu vermeiden. Die pH-Wert-Einstellung einer Lösung erfolgte mit 0,1 M NaOH. Die Messung erfolgte zur Vermeidung von Zeitunterschieden bei Einzelmessungen auf 96-Mikrotiterplatten, die mit 170 µl Substrat- und Indikatorlösung (4:1) und 40 µl Probe (Positivkontrolle, Negativkontrolle oder Enzymextrakt) befüllt wurden. Die Inkubationstemperatur betrug RT.

Das Probenmaterial für die Extraktionen der Ansätze 3.2 und 3.3. (Tabelle 5) bestand aus dem Fruchtfleisch eines reifen im Supermarkt erworbenen Apfel. Das Fruchtfleisch wurde gefroren und ein Teil gefriergetrocknet. Zusätzlich wurde noch das Fruchtfleisch eines unreifen Apfels eingefroren. Das gefrorene Fruchtfleisch wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert und das gefriergetrocknete gemahlen. Die Extraktionen der Ansätze 3.2 bis 3.4 wurden nach dem Protokoll der jeweiligen Quelle (Tabelle 5) durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde im Photometer (iEMS Reader MF, Labsystems, Finnland) bei 620 nm über eine Zeit bis zu 240 min in 2 oder 5 min-Intervallen gemessen, wobei vor jeder Messung eine Homogenisation stattgefunden hatte.

GAL-Aktivität

100 mg pulverisiertes Probenmaterial wurde mit 1000 µl kaltem Extraktionspuffer (50 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 4,5 + 1 M NaCl + 1 % Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)) gemischt und homogenisiert. Zur besseren Pelletierung wurden die Proben 3-mal abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 17000 g), wobei die Proben zwischen jeder Zentrifugation homogenisiert wurden. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und aufgeteilt. Eine Teilprobe wurde bei 100 °C für 10 min erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren, so dass eine Negativkontrolle zur jeweiligen Probe vorhanden ist. Eine 96-Mikrotiterplatte wurde in Triplikaten mit jeweils 30 µl Probe oder Kalibrierlösung befüllt. Die Kalibrierlösung bestand aus 1,2 mM p-Nitrophenol (PNP) + 1 M NaCl in 50 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 4,5, welche in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 0 – 0,6 mM verwendet wurde. In jede Vertiefung wurde weiterhin 30 µl Substratlösung (4 mM p-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid (PNP-GAL)) hinzugefügt, wovon sich bei Enzymaktivität PNP abspaltet. Die Mikrotiterplatte wurde bei 40 °C für 60 min unter Rotation inkubiert (iEMS Incubator/ Shaker HT, Labsystems, Finnland). Um die Enzymreaktion zu stoppen und die Gelbfärbung von PNP im basischen Milieu, die abhängig von

der Konzentration ist, einzuleiten, wurde nach der Inkubationszeit 150 µl Stopplösung (0,4 M Na₂CO₃) in jede Vertiefung gegeben und im Photometer (iEMS Reader MF, Labsystems, Finnland) mit vorheriger Homogenisation bei 410 nm gemessen. Die Berechnung der GAL-Aktivität in [µ*M PNP* * 100*mg* TS^{-1} * h^{-1}] erfolgte anhand der Kalibriergeraden.

3.7. Genexpression

Die Bestimmung der Genexpression der Ethylenbiosyntheseenzyme (MdACS3a, MdACS1, MdACO1), der Ethylenrezeptoren (MdETR1, MdETR2, MdERS1, MdERS2) und Ethylensignaltransduktionsproteinen (MdCTR1, MdERF1) sowie der zellwandmodifizierenden Proteine (MdPG, MdPL, MdGAL, MdAF1, MdPME, MdXYL, MdGLU, MdXTH2, MdXTH10, MdEXP2) erfolgte im Versuchsjahr 2013/14 zu den Probennahmen 1, 4 und 6 der Sorten ,Elstar' und ,Pinova' (Tabelle 4) und wurden am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam durchgeführt.

Das Probenmaterial bestand aus einer Mischprobe des Fruchtfleisches und der Schale (1:1) der Äquatorialebene von 7 Früchten je Behandlungsvariante in dreifacher Wiederholung (Abbildung 8). Das Probengemisch wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die RNA-Extraktion wurde nach Harb et al. (2012) durchgeführt. Dazu wurde 8 g des Probenmaterials in flüssigem Stickstoff gemahlen, mit 20 ml vorgewärmten (65 °C) Extraktionspuffer (100 mM Tris–HCl pH 8.0 + 25 mM EDTA + 2 M NaCl + 2 % Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) + 2 % PVP 40 + 2 % β -Mercaptoethanol) vermengt und bei 65 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, RT, 7740 g). Der Überstand der zentrifugierten Probe wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, homogenisiert und zentrifugiert (10 min, RT, 7740 g). Die wässrige Phase wurde wiederaufgenommen und der Schritt wiederholt. Die abermals aufgenommene und nun gereinigte wässrige Phase wurde durch Zugabe von LiCl bei einer finalen Konzentration von 2,5 M über Nacht bei 4 °C gefällt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (60 min, 4° C, 7740 g), der Überstand verworfen und das Pellet zweimal in einem Volumen 70 % EtOH gewaschen (1 min, 4°C, 7740 g) und getrocknet. Das Pellet wurde in Ribonuklease (RNAse)-freiem Wasser durch Erhitzen auf 65 °C für 5 min resuspendiert. Unlösliche Partikel wurden durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 15800 g) pelletiert und der Überstand mit RNeasy[®] MinElute[®] Cleanup Kit (Qiagen, USA) weiter aufgereinigt. Im Anschluss folgte eine Desoxyribonuklease (DNAse)-Behandlung mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, USA). Die Qualität und Quantität der extrahierten Ribonukleinsäure (engl. "ribonucleid acid" (RNA) wurde spektrophotometrisch und elektrophoretisch geprüft. Die RNA wurde mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Deutschland) in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. "complementary deoxyribonucleic acid" (cDNA))

31

umgeschrieben und nachfolgend wurde eine Quantitative Echt-Zeit-Kettenreaktion (engl. ",quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction" (qPCR)) nach Harb et al. (2015) durchgeführt. Verwendet wurden die Primersequenzen für die Gene der Ethylenbiosynthese- und -signaltransduktion aus Harb et al. (2012) und für die Gene der zellwandmodifizierenden Proteine aus Kittemann (2012) (Tabelle 6). Die qPCR wurde mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied biosystems, UK) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die so erhaltenen Zyklusschwellenwerte (engl. "cycle threshold" (ct)) wurden nach der ∆ct-Methode (Karlen *et al.*, 2007) mit den Formeln 6 und 6.1 ausgewertet:

 $\Delta ct = ct_{Zielgen} - ct_{Referenzgen}$,

wobei als Referenzgen Ubiquitin verwendet wurde.

(5)

(5.1)

relative Expression = $2^{-\Delta ct}$.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer für die Bestimmung der Expression der Gene der Ethylenbiosynthese, Ethylenrezeptoren und Ethylensignaltransduktionsproteinen nach Harb et al., (2012) sowie der zellwandmodifizierenden Proteine nach Kittemann (2012).

Gruppe	Gen	Vorwärts	Rückwärts
	MdACO1	TCTACAACCCAGGCAACGACTC	AGCTTCAAATCTTGGCTCCTTG
Ethylenbiosynthese-		AT	GC
Enzyme	MdACS1	TAGGTCCAACACCTTTGAAGCC	CAACCAGGTTCCGTGCAATGAC
,		GA	
	MdACS3	AATTIGCCATIGCCTTICIG	IGAGICAAGCAACCCAICIG
	MdETR1	TATCGCATACACAGAACGAGG	ATTGCACAAGGGTACACCGAG
		CGT	ACT
Ethylenrezeptoren	MdETR2	GCACAATAGCAAGGTCTGAGC	CTCGGAGACAACTTAACCAAAG
und Ethylensignal- transduktions-	MdERS1	ACCAGGTCCAGATTGCCACCTA AA	CAATCCCTAAAGGCGGGTTTGT GT
proteine	MdERS2	CTCGTTGGATGCAAACCATC	TCCCAGGTTGAGCTAATGTCT
	MdCTR1	ACAAGATTTTCATGCCGAAC	TATGGACAAGTTTGGAGGCT
	MdERF1	ATGACCTGGTGGCATATCAG	CACCGTAGCAAACAACACAC
	MdPG	GGAATTGATCAGGCCAAGAA	GCTCCACTGGAAGAACAAGC
	MdPL	ACCTCGCTTTGTTTCTCTGAGG	GTCAACACTTCAACACTTGTCTT
		СТ	СТС
	MdAF1	GAATCGAGCGATGTCATCAGG ACT	CGACTGACCACATACTACATGC CA
	MdGAL	TCAACTCTGCCACTCTCTCTG T	TCCCTTGCTTCTGAAACGCTCA
Zellwand-	MdPME	TAAATGTCGAGGTCGGGAAG	TAAACCCATCACCAACAGCA
modifizierenden Proteine	MdEXP2	AGCACTTTGATTTGGCTGAGCC TG	TCCCTTCTTCACACACGAAACCC T
	MdXTH10	CAATCCCCAAGAAGCTGAAAG ACTG	TCTGCTCCGGTGGTGATGCTT
	MdXTH2	TCAGGCACTTCCCGTTGTCCTT	GCCCTGTGGAATCGAGTGACT GA
	MdXYL	TGCTGATGTTCTATTCGGCACT ACA	ACACAACTGGGCCCTTGTAAAA TCT
	MdEGase	ATGTCCTCTATGGCGAGGTG	CTTGTAAGCCTGGCGGTTAG

3.8. Statistik

Die statistische Datenauswertung wurde mit der OpenSource Software R (Version 3.4.4.) durchgeführt. Die Varianzanalyse erfolgte mit dem R-Paket nmle und der R-Funktion Ime, da aufgrund der Datenstruktur die Anwendung von linearen und nichtlinearen gemischten Modellen notwendig war. Für die Berechnung der paarweisen Mittelwertvergleiche nach signifikanter Varianzanalyse (p < 0,05) wurde das R-Paket Ismeans und mit der R-Funktion Ismeans mit dem Argument cld verwendet, welches die Vergleiche nach der Tukey-Methode mit α = 5 % durchführt. Faktoren, die zu keinem signifikanten Unterschied einer Variablen führten, wurden zusammengefasst. Die Einteilung der drei Phasen der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme wurde folgendermaßen festgelegt:

- I. Phase: alle Zeitpunkte vom Lagerbeginn ausgehend, die keine signifikante Abnahme aufweisen.
- II. Phase: Zeitpunkte im Anschluss an die I. Phase, die eine signifikante Abnahme zeigen.
- III. Phase: Zeitpunkte im Anschluss an die II. Phase, die keine signifikante Abnahme aufweisen.

Zur Prüfung des sigmoidalen Verlaufs der Fruchtfleischfestigkeit wurden die Graphen mittels OriginPro 2017 (OriginLab, USA) an die Boltzmann-Funktion, die in Formel 7 wiedergegeben ist, angepasst. Der Wert 0,7 des korrigierten Bestimmtheitsmaßes r^2 der Kurve wurde als Schwellenwert gesetzt, so dass bei einem $r^2 > 0,7$ der Verlauf als sigmoidal gilt.

$$y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{1 + e^{\frac{(X - X0)}{dx}}},$$
(6)

wobei A1 für den Anfangswert, A2 für den Endwert, e für die eulersche Zahl, x0 für den Wendepunkt und dx für den Grad des Gefälles stehen.

Die Berechnung der Korrelation erfolgte mit der Pearson's Produkt-Moment-Korrelation aus R-Funktion *cor.test*. dem R-Paket stats und der Für die Berechnung der Hauptkomponentenanalyse (engl. "Principal Component Analysis") wurden fehlende Werte einer Wiederholung wurden interpoliert, indem die Werte der restlichen Wiederholung gemittelt wurden. Die Durchführung der Hauptkomponentenanalyse erfolgte mit der R-Funktion prcomp aus dem R-Pakte stats. Die Daten für die Hauptkomponentenanalyse wurden mit der z-Transformation standardisiert. Für die graphische Darstellung des Biplots wurden die R-Pakete gaplot2, gafortify und garepel benötigt und die R-Funktion autoplot verwendet.

4. Ergebnis

4.1. Fruchtfleischfestigkeit

4.1.1 Versuchsjahr 2012/13

Im Versuchsjahr 2012/13 zeigte der Faktor Erntetermin lediglich geringe Unterschiede in der Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit und die Ethylen-Behandlung der E9-Variante (Tabelle 3) führte beim späten Erntetermin (Abbildung A. 1) zu keinem signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (K-Variante), so dass in diesem Teil der frühe Erntetermin beschrieben wird.

Unbehandelte Kontrolle

Der Anfangswert der Sorte ,Elstar' (Abbildung 10A) lag bei 65 N und der Sorte ,Pinova' (Abbildung 10B) bei 80 N. Der sigmoidale Verlauf der K-Variante der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme war bei ,Elstar' mit $r^2 = 0,98$ gegeben, bei ,Pinova' mit $r^2 = 0,59$ nicht, so dass nur bei ,Elstar' die drei Phasen der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme ersichtlich wurden.

Bei ,Elstar' ging die I. Phase der K-Variante bis 18 Tagen Lagerdauer und bei ,Pinova' bis zum Ende des Versuchszeitraumes an. Die II. Phase bei ,Elstar' dauerte 11 Tage, da die III. Phase nach 29 Tagen Lagerdauer begann. Damit wies ,Pinova' durchgehend signifikant höhere Werte der Fruchtfleischfestigkeit gegenüber ,Elstar' auf.

In der K-Variante wies ,Pinova' durchgehend signifikant höhere Werte als ,Elstar' auf (Tabelle 8).

Tabelle 7: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer
der Fruchtfleischfestigkeit des Versuchsjahres 2012/13 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler
Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des
sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene
Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Lagerdauer [Tage]											
Juite	0	2	7	9	11	18	31	45	57	73	87
,Elstar'	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
,Pinova'	а	а	а	а	а	а	а	а	а	а	а

1-MCP-Behandlung

Bei der Sorte ,Elstar' wiesen die 1-Methylcyclopropen (1-MCP)-Behandlungen der MO- und M7-Variante (Tabelle 3) keine signifikanten Unterschiede zueinander auf, so dass diese zu einer $M_{0,7}$ -Variante zusammengefasst wurden. Bei der Sorte ,Pinova' wies keine der 1-MCP-Varianten einen signifikanten Unterschied auf, so dass die M0-, M7-, M0+E9- und M7+E9-Variante (Tabelle 3) zu einer $M_{0,7,+E9}$ -Variante zusammengefasst wurden.

Die I. Phase der $M_{0,7}$ -Variante bei ,Elstar' ging bis zum 57. Tag der Lagerdauer und der $M_{0,7,+E9}$ -Variante bei ,Pinova' bis zum Ende des Versuchszeitraumes. Die II. Phase der $M_{0,7}$ -Variante bei ,Elstar' verlief dann bis zum Ende des Versuchszeitraumes.

Ethylen-Behandlung

Bei der Sorte ,Elstar' wiesen die Ethylen-Behandlungen der M0+E9- und M7+E9-Varianten (Tabelle 3) keine signifikanten Unterschiede zueinander auf, so dass diese zu einer $M_{0,7}$ +E9-Variante zusammengefasst wurden.

Bei ,Elstar' ging die I. Phase der $M_{0,7}$ +E9-Variante bis 45 und der E9-Variante bis 11 Tage Lagerdauer. Bei ,Pinova' verlief die I. Phase der E9-Variante bis zum 63. Tag der Lagerdauer und die II. Phase dauerte bis zum Ende des Versuchszeitraumes an. Die II. Phase bei ,Elstar' dauerte in der $M_{0,7}$ +E9-Variante ebenfalls bis zum Ende des Versuchszeitraumes an und der E9-Variante für 19 Tage, da die III. Phase am Tag 30 der Lagerdauer erreicht wurde.



Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit [N] der Sorten ,Elstar' (A) und ,Pinova' (B) über eine 3monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Der statistische Vergleich (p < 0,05) der Probennahmezeitpunkte im zeitlichen Verlauf einer Behandlung führte zur Einteilung der drei Phase (nichtsignifikante Abnahme (I), signifikante Abnahme (II), nichtsignifikante Veränderung (III)) der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme. Der sigmoidale Verlauf der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme der K-Variante wurde mit der Boltzmann-Funktion (schwarze durchgehende Linie) beschrieben (r^2 = adjustierte Korrelationskoeffizient; x0 = Wendepunkt der Funktion). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert mit Standardabweichung, wobei nichtsignifikante Behandlungsvarianten zusammengefasst wurden. K = unbehandelte Kontrolle (n = 24); M_{0,7} = 1-MCP-Behandlung am Tag 0 sowie am Tag 7 der Lagerdauer (n = 48); $M_{0,7+E9}$ = 1-MCP-Behandlung am Tag 0 sowie am Tag 7 der Lagerdauer und 1-MCP-Behandlung am Tag 0 sowie 7 der Lagerdauer mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tage Lagerdauer (n = 96); E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 24); $M_{0.7}$ +E9 = 1-MCP-Behandlung am Tag 0 mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer und 1-MCP-Behandlung am Tag 7 mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 48).

4.1.2 Versuchsjahr 2013/14

Im Versuchsjahr 2013/14 zeigte der Faktor Erntetermin lediglich zu einzelnen Zeitpunkten signifikante Unterschiede in der Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit. Außerdem wies die E9-Variante bei der Sorte ,Golden Delicious' beim späten Erntetermin keinen signifikanten Unterschied zur K-Variante auf (Abbildung A. 2), so dass der mittlere Erntetermin beschrieben wird.

Unbehandelte Kontrolle

Der Anfangswert der Sorte ,Elstar' (Abbildung 11A) lag bei 70 N, der Sorte ,Pinova' (Abbildung 11B) bei 83 N und der Sorte ,Golden Delicious' (Abbildung 11C) bei 73 N. Der sigmoidale Verlauf der K-Variante der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme war bei allen drei Sorten mit $r^2 = 0,98$, $r^2 = 0,95$ bzw. $r^2 = 0,97$ gegeben. Trotzdem konnte eine Einteilung der drei Phasen der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme bei ,Pinova' nicht durchgeführt werden, da der Wendepunkt mit x₀ = 112,11 nach dem Versuchszeitraum lag.

Die I. Phase der K-Varianten verlief bei "Elstar' bis 14 Tage, bei "Pinova' bis 70 Tage und bei "Golden Delicious' bis 8 Tage Lagerdauer. Die II. Phase dauerte bei "Elstar' 42 Tage, bei "Pinova' bis zum Ende des Versuchszeitraumes an und bei "Golden Delicious' 21 Tage. Die III. Phase wurde von "Elstar' am 56. Tag und von "Golden Delicious' am 29. Tag der Lagerdauer erreicht. Damit wies "Pinova' durchgehend signifikant höhere Werte als "Elstar' und "Golden Delicious' auf. "Golden Delicious' wies im Zeitraum von 14 bis 42 Tagen Lagerdauer, was größtenteils die II. Phase von "Golden Delicious' eindeckt, signifikant niedrigere Werte als "Elstar' auf.

In der K-Variante wies ,Pinova' durchgehend signifikant höhere Werte als ,Elstar' und ,Golden Delicious' auf. Im Zeitraum 14 bis 56 Tage Lagerdauer wies außerdem ,Elstar' signifikant höhere Werte als ,Golden Delicious' auf (Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der Fruchtfleischfestigkeit des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Sorto	Lagerdauer [Tage]										
Sonte	0	7	14	21	28	42	56	70	84	98	112
,Elstar'	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
,Pinova'	а	а	а	а	а	а	а	а	а	а	а
,Golden Delicious'	b	b	С	С	С	С	с	b	b	b	b

1-MCP-Behandlung

Die I. Phase der M1+E3-Variante bei ,Elstar' verlief bis 42 Tage, bei ,Pinova' bis zum Ende des Versuchszeitraumes und bei ,Golden Delicious' bis 43 Tage der Lagerdauer. Die II. Phase

dauerte sowohl bei ,Elstar' als auch bei ,Golden Delicious' bis zum Ende des Versuchszeitraumes an.

Ethylen-Behandlung

Die I. Phase der E9-Varianten verlief bei ,Elstar' bis 7 Tage, bei ,Pinova' bis 56 Tage und bei ,Golden Delicious' lediglich bis zum Tag der Einlagerung. Die II. Phase dauerte bei ,Elstar' 49 Tage, bei ,Pinova' bis zum Ende des Versuchszeitraumes an und bei ,Golden Delicious' 27 Tage. Die III. Phase wurde von ,Elstar' am 56. Tag und von ,Golden Delicious' am 29. Tag der Lagerdauer erreicht.



Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit [N] der Sorten "Elstar" (A), "Pinova" (B) und "Golden Delicious' (C) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 21) mit Standardabweichung. Der statistische Vergleich (p < 0,05) einzelner der Probennahmezeitpunkte im zeitlichen Verlauf einer Behandlung führte zur Einteilung der drei Phase der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme (nichtsignifikante Abnahme (I), signifikante nichtsignifikante Veränderung (111)). Der Abnahme (II), sigmoidale Verlauf der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme der K-Variante wurde mit der Boltzmann-Funktion (schwarze durchgehende Linie) beschrieben (r^2 = adjustierte Korrelationskoeffizient; x₀ = Wendepunkt der Funktion).

4.2 Ethylenbiosynthese

Die statistische Auswertung der Daten der ACC-Synthase (ACS)- und ACC-Oxidase (ACO)-Aktivität sowie der Ethylenproduktion wurde anhand von Wurzel-transformierten Daten durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Mittelwerten der Originaldaten.

4.2.1 Versuchsjahr 2012/13

Im Versuchsjahr 2012/13 zeigte der Faktor Erntetermin zwar einen signifikanten Unterschied in der ACO-Aktivität und der Ethylenproduktion, der sich in unterschiedlichen Absolutwerten zum gleichen Zeitpunkt und bei "Elstar" in einem früheren Anstieg in der ACO-Aktivität und der Ethylenproduktion äußerte (Abbildung A. 3), trotzdem wird in Anlehnung an die Darstellung der Ergebnisse der Fruchtfleischfestigkeit hier ebenfalls der frühere Erntetermin beschrieben. Der Faktor Erntetermin erwies sich bei der ACS-Aktivität als nichtsignifikant und wurde daher zusammengefasst.

Unbehandelte Kontrolle

Zum Lagerbeginn wies die Ethylenproduktion der K-Variante der Sorte ,Elstar' 0,5 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und der Sorte ,Pinova' 0,1 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ auf, die ACO-Aktivität betrug bei ,Elstar' 10 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ und bei ,Pinova' 3 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ und die ACS-Aktivität war bei beiden Sorten nicht messbar (Abbildung 12).

Der signifikante Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn erfolgte in der Ethylenproduktion bei "Elstar' am Tag 31 und bei "Pinova' am Tag 34 der Lagerdauer, in der ACO-Aktivität am Tag 31 bzw. am Tag 7 der Lagerdauer und in der ACS-Aktivität am Tag 87 bzw. Tag 48 der Lagerdauer.

Das Maximum der Ethylenproduktion wurde von "Elstar" am Tag 45 mit 43 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und von "Pinova" am Tag 48 mit 51 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹, der ACO-Aktivität am Tag 45 mit 195 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ bzw. am Tag 62 mit 197 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und der ACS-Aktivität jeweils am Tag des Maximums mit 0,24 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ bzw. 0,19 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ erreicht.

Der Sortenvergleich der K-Variante (Tabelle 9) zeigte in der Ethylenproduktion von ,Pinova' am Tag 7 der Lagerdauer signifikant höhere Werte auf als ,Elstar' und am Tag 31 der Lagerdauer wies ,Elstar' signifikant höhere Werte als ,Pinova' auf. In der ACO-Aktivität zeigte die K-Variante von ,Pinova' signifikant höhere Werte im Zeitraum von 7 bis 11 Tage Lagerdauer als ,Elstar' auf. In der ACS-Aktivität wies die K-Variante von ,Pinova' am Tag 44 signifikant höhere Werte als ,Elstar' und am Tag 86 der Lagerdauer wies ,Elstar' signifikant höhere Werte als ,Pinova' auf.

Tabelle 9: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der Ethylenproduktion, ACO- und ACS-Aktivität des Versuchsjahres 2012/13 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Daramator	Sorto		Lagerdauer [Tage]									
Parameter	Juite	0	2	7	9	11	18	31	45	57	73	87
Ethylen- produktion	, Elstar' , Pinova'	ns	ns	b a	ns	ns	ns	a b	ns	ns	ns	ns
ACO- Aktivität	,Elstar' ,Pinova'	ns	ns	b a	b a	b a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ACS- Aktivität	,Elstar' ,Pinova'	ns	-	-	-	ns	-	-	b a	-	-	a b

Die 1-MCP-Behandlungsvarianten erwiesen sich bei der ACS-Aktivität als nichtsignifikant und wurden daher zu einer 1-MCP-Behandlung ($M_{0,7,+E9}$) zusammengefasst.

Der signifikante Anstieg in der Ethylenproduktion der MO- bzw. M7-Variante bei ,Elstar' erfolgte bei beiden Variante am Tag 73 und bei ,Pinova' am Tag 62 der Lagerdauer, in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' geschah am Tag 57 bzw. 73 der Lagerdauer und bei ,Pinova' am Tag 48 bzw. 9 der Lagerdauer. Der signifikante Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn in der ACS-Aktivität der M_{0,7,+E9}-Variante bei ,Elstar' erfolgte am Tag 87, der ebenfalls der Zeitpunkt des Maximums mit 0,10 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ war, und bei ,Pinova' kam es zu keinem signifikanten Anstieg.

Das Maximum in der Ethylenproduktion der MO- bzw. M7-Variante bei ,Elstar' wurde von beiden Varianten am Tag 87 der Lagerdauer mit 22 bzw. 14 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ und bei ,Pinova' von beiden Varianten am Tag 86 der Lagerdauer mit 23 bzw. 25 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ sowie in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' von beiden Variante ebenfalls am Tag 87 mit 170 bzw. 164 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ und bei ,Pinova' am Tag 76 bzw. 86 der Lagerdauer mit 93 bzw. 112 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ erreicht.

Ethylen-Behandlung

Der signifikante Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn erfolgte bei der E9-Variante in der Ethylenproduktion bei ,Elstar' am Tag 11 und bei ,Pinova' am Tag 19 der Lagerdauer, in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' am Tag 18 und bei ,Pinova' am Tag 12 der Lagerdauer und in der ACS-Aktivität bei ,Elstar' am Tag 87 und bei ,Pinova' am Tag 48 der Lagerdauer. Das Maximum wurde in der Ethylenproduktion bei ,Elstar' am Tag 87 und bei ,Pinova' am Tag 34 mit jeweils 43 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹, in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' am Tag 31 mit 225 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und bei ,Pinova' am Tag 76 mit 223 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und in der ACS-Aktivität am Tag 87 mit 0,28 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ und bei ,Pinova' am Tag 48 mit 0,32 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ erreicht.

Der signifikante Anstieg in der Ethylenproduktion der M0+E9- bzw. M7+E9-Variante bei ,Elstar' erfolgte bei beiden Variante am Tag 57 und bei ,Pinova' am Tag 62 der Lagerdauer, in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' geschah am Tag 45 bzw. 57 der Lagerdauer und bei ,Pinova' am Tag 12 bzw. 34 der Lagerdauer. Das Maximum in der Ethylenproduktion wurde bei ,Elstar' von beiden Varianten am Tag 87 der Lagerdauer mit 30 bzw. 29 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ und bei ,Pinova' von beiden Varianten am Tag 86 der Lagerdauer mit 30 bzw. 25 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ sowie in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' am Tag 73 bzw. 87 mit 218 bzw. 210 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ und bei ,Pinova' von beiden Variante am Tag 76 der Lagerdauer mit 177 bzw. 162 nl $C_2H_4*g^{-1}*h^{-1}$ erreicht.



Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Ethylenproduktion [μl C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹] (Α, Β), ACO-Aktivität [nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹] (C, D) und ACS-Aktivität [nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹] (E, F) der Sorten ,Elstar' (A, C, E) und ,Pinova' (B, D, F) über eine 3-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin dieser Sorten war für die ACO-Aktivität sowie die Ethylenproduktion jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters und für die ACS-Aktivität aufgrund von Nichtsignifikanz der Mittelwert aus Anfang und Ende des sortentypischen Erntefensters. Die Früchte erhielten vor der Analyse eine Akklimatisierung an RT und die Probennahme für die Messung der Ethylenproduktion fand bei 20 °C nach 2 h statt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Originaldaten mit Standardabweichung, wobei nichtsignifikante Behandlungsvarianten zusammengefasst wurden. (A, B) K = unbehandelte Kontrolle (n = 6); M = Mittelwert der 1-MCP-Behandlung am Tag 0 und 7 der Lagerdauer sowie der 1-MCP-Behandlung am Tag 0 und 7 der Lagerdauer mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tage Lagerdauer (n = 24); E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer. (C, D, E, F) K = unbehandelte Kontrolle (n = 3); M0 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer (n = 3); M7 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer (n = 3); E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 3); M0+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 3); M7+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 3). Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf den Beginn einer signifikant (p < 0,05) erhöhten Enzymaktivität bzw. Ethylenproduktion in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzel-transformierten Daten.

4.2.2 Versuchsjahr 2013/14

Im Versuchsjahr 2013/14 zeigte der Faktor Erntetermin einen signifikanten Unterschied in der ACO-Aktivität und der Ethylenproduktion, der sich lediglich beim späteren Erntetermin in einem früheren Anstieg oder höheren Absolutwerten zum gleichen Zeitpunkt äußert im Vergleich zum optimalen Erntetermin (Abbildung A. 4). Daher wird in Anlehnung an das Versuchsjahr 2012/13 ebenfalls der frühere Erntetermin beschrieben.

Unbehandelte Kontrolle

Zum Lagerbeginn wies die K-Variante sowohl in der Ethylenproduktion als auch der ACO-Aktivität der Sorte ,Elstar' keinen messbaren Wert auf. Bei der Sorte ,Pinova' zeigte die Ethylenproduktion der K-Variante $2 \mu l C_2 H_4 * kg^{-1} * h^{-1}$ und der Sorte ,Golden Delicious' $4 \mu l C_2 H_4 * kg^{-1} * h^{-1}$ und die ACO-Aktivität 5 bzw. 6 nl $C_2 H_4 * g^{-1} * h^{-1}$. Der signifikante Anstieg in der Ethylenproduktion bzw. der ACO-Aktivität erfolgte bei ,Elstar' und ,Pinova' am Tag 21 bzw. 7 und bei ,Golden Delicious' jeweils am Tag 8 der Lagerdauer. Das Maximum der Ethylenproduktion bzw. der ACO-Aktivität wurde bei ,Elstar' am Tag 70 bzw. 42 der Lagerdauer mit 29 $\mu l C_2 H_4 * kg^{-1} * h^{-1}$ bzw. 326 nl $C_2 H_4 * g^{-1} * h^{-1}$, bei ,Pinova' jeweils am Tag 42 der Lagerdauer mit 30 $\mu l C_2 H_4 * kg^{-1} * h^{-1}$ bzw. 275 nl $C_2 H_4 * g^{-1} * h^{-1}$ und bei ,Golden Delicious' am Tag 43 bzw. 29 der Lagerdauer mit 95 $\mu l C_2 H_4 * kg^{-1} * h^{-1}$ bzw. 443 nl $C_2 H_4 * g^{-1} * h^{-1}$ erreicht.

Die ACS-Aktivität der K-Variante zeigte sowohl bei 'Elstar' als auch bei 'Pinova' über die gesamte Lagerdauer keine messbaren Werte auf. 'Golden Delicious' dagegen wies zum Lagerbeginn zwar ebenfalls keinen messbaren Wert auf, aber der signifikante Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn erfolgte am Tag 8 der Lagerdauer und das Maximum wurde am Tag 99 mit 1,5 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ erreicht.

Aufgrund fehlender Werte wurde der Sortenvergleich der K-Variante in der Ethylenproduktion sowie in der ACO-Aktivität lediglich für den Zeitraum 0 bis einschließlich 70 Tage Lagerdauer durchgeführt (Tabelle 10). In diesem Zeitraum zeigte ,Golden Delicious' signifikant höhere Werte als ,Elstar' bzw. ,Pinova' in der Ethylenproduktion von 7 bis 70 Tagen Lagerdauer sowie in der ACO-Aktivität von 7 bis 42 Tagen Lagerdauer. Die K-Variante von ,Golden Delicious' zeigte während über den gesamten Versuchszeitraum signifikant höhere Werte der ACS-Aktivität als ,Elstar' und ,Pinova'.

Tabelle 10: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der Ethylenproduktion, ACO- und ACS-Aktivität des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Daramatar	Sarta					Lager	dauer	[Tage	e]			
Parameter	Sonte	0	7	14	21	28	42	56	70	84	98	112
Ethylop	,Elstar'	b	С	С	С	С	С	b	С			
Etrivien-	,Pinova'	а	b	b	b	b	b	b	b	-	-	-
produktion	,Golden Delicious'	а	а	а	а	а	а	а	а			
ACO-	,Elstar'	b	с	С	с	b	b	ab				
Aktivität	,Pinova'	а	b	b	b	b	С	b	ns	-	-	-
	,Golden Delicious'	а	а	а	а	а	а	а				
ACS-	,Elstar'		а	а	а	а	а	а	а	а	а	а
Aktivität	,Pinova'	ns	а	а	а	а	а	а	а	а	а	а
	,Golden Delicious'		b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

1-MCP-Behandlung

Der signifikante Anstieg der M1+E3-Variante erfolgte in der Ethylenproduktion bei ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious' am Tag 28 der Lagerdauer, in der ACO-Aktivität bei ,Elstar' am Tag 21, bei ,Pinova' am Tag 7 und bei ,Golden Delicious' am Tag 28 der Lagerdauer und in der ACS-Aktivität bei ,Pinova' am Tag 112 und bei ,Golden Delicious' am Tag 57 der Lagerdauer. Das Maximum in der Ethylenproduktion wurde von ,Elstar' am Tag 84 mit 26 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹, von ,Pinova' am Tag 70 mit 14 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und von ,Golden Delicious' am Tag 70 mit 70 μ l C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹, in der ACO-Aktivität von ,Elstar' am Tag 70 mit 224 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹, von ,Pinova' am Tag 112 mit 141 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ und von ,Golden Delicious' am Tag 57 mit 356 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ sowie in der ACS-Aktivität von ,Golden Delicious' am Tag 99 mit 1,2 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ erreicht.

Ethylen-Behandlung

Der signifikante Anstieg der E3-Variante erfolgte in der Ethylenproduktion bei "Elstar" am Tag 14, bei "Pinova" am Tag 21 und bei "Golden Delicious" am Tag 8 der Lagerdauer, in der ACO-Aktivität bei "Elstar" und "Pinova" am Tag 7 und bei "Golden Delicious" am Tag 8 der Lagerdauer und in der ACS-Aktivität bei "Golden Delicious" am Tag 15 der Lagerdauer. Das Maximum in der Ethylenproduktion wurde von "Elstar" am Tag 70 mit 22 µl C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹, von "Pinova" am Tag 42 mit 27 µl C₂H₄*kg⁻¹*h⁻¹ und von "Golden Delicious" am Tag 42 mit 308 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ bzw. 275 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ und von "Golden Delicious" am Tag 22 mit 489 nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹ sowie in der ACS-Aktivität von "Golden Delicious" am Tag 28 mit 1,0 nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹ erreicht.



Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Ethylenproduktion [μ1*kg⁻¹*h⁻¹] (A, B, C), ACO-Aktivität [nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹] (D, E, F) und ACS-Aktivität [nmol ACC*kg⁻¹*s⁻¹] (G, H, I) der Sorten ,Elstar' (A, D, G), ,Pinova' (B, E, H) und ,Golden Delicious' (C, F, I) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf den Beginn einer signifikant (p < 0,05) erhöhten Enzymaktivität bzw. Ethylenproduktion in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzel-transformierten Daten. Fehlende Datenpunkte innerhalb der Zeitreihe beruhen auf einem defekten Gaschromatographen zu diesen Zeitpunkten.

4.3 Genexpression der Ethylenbiosynthese-Enzyme und

Ethylensignaltransduktionsproteine

Die Messung der relativen Genexpression der Ethylenbiosynthese-Enzyme und der Ethylensignaltransduktionsproteine wurde im Versuchsjahr 2013/14 durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Mittelwerten der Originaldaten. Zur Erfüllung der Varianzhomogenität und Normalverteilung wurden signifikante Unterschiede in der relativen Genexpression von MdACO1, MdETR2 und MdACS1 bei "Elstar" an log-transformierten Daten und von MdACS3 bei "Pinova" an Wurzel-transformierten Daten berechnet.

4.3.1 Ethylenbiosynthese-Enzyme

Unbehandelte Kontrolle

Die relative Genexpression von MdACO1 zeigte bei "Elstar' und "Pinova' ab 21 Tagen (Abbildung 14A, B) und von MdACS1 bei "Elstar' ab 21 Tagen und bei "Pinova' ab 42 Tagen Lagerdauer der K-Variante signifikant höhere Werte gegenüber dem Lagerbeginn (Abbildung 14C, D). Die relative Genexpression von MdACS3 der K-Variante wies bei beiden Sorten keine zeitliche Veränderung auf (Abbildung 14E, F).

In der K-Variante hatte ,Elstar' in der relativen Genexpression von MdACO1 am Tag des Lagerbeginns und von MdACS1 am Tag 42 der Lagerdauer signifikant höhere Werte als ,Pinova'. ,Pinova' wies am Tag des Lagerbeginns in der relativen Genexpression von MdACS3 signifikant höhere Werte als ,Elstar' auf (Tabelle 11).

Tabelle 11: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der Genexpression von MdACO1, MdACS1 und MdACS3 des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Daramatar	Sorto	Lagei	Lagerdauer [Tage				
Parameter	Sorte	0	21	42			
	,Elstar'	20	20	а			
MdAC01	,Pinova'	ns	ns	b			
MdACS1	,Elstar' ,Pinova'	b a	ns	ns			
MdACS3	,Elstar' ,Pinova'	b a	ns	ns			

1-MCP-Behandlung

Die relative Genexpression von MdACO1 wies bei beiden Sorten durchgehend (Abbildung 14A, B) und von MdACS1 bei beiden Sorten Tag 42 der Lagerdauer der M1+E3-Variante signifikant niedrigere Werte auf als die K-Variante (Abbildung 14C, D). Die relative Genexpression von 44 MdACS3 zeigte bei ,Pinova' am Tag 42 der Lagerdauer der M1+E3-Variante signifikant höhere Werte als die K-Variante (Abbildung 14F).

Ethylen-Behandlung

Die relative Genexpression von MdACS1 bei ,Elstar' war am Tag 21 der Lagerdauer signifikant erhöht im Vergleich zur K-Variante (Abbildung 14C).



Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der Ethylenbiosynthese-Enzyme MdACO1 (A, B), MdACS1 (C, D) und MdACS3 (E, F) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten ,Elstar' (A, C, E) und ,Pinova' (B, D, F) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Post-hoc Test nach der Tukey-Methode berechnet worden sind. Die Berechnungen für die Genexpression von MdACO1 und MdACS1 bei ,Elstar' beruhen auf log-transformierten Daten und von MdACS3 bei ,Pinova' auf Wurzel-transformierten Daten.

4.3.2 Ethylensignaltransduktionsproteine

Unbehandelte Kontrolle

Die relative Genexpression von Md-ETHYLENE RESPONSE SENSOR (ERS) 1 wies bei ,Elstar' ab Tag 42 und bei ,Pinova' ab 21 Tagen (Abbildung 15E, F) und von Md-ETHYLENE RESPONSE FACTOR

(ERF) 1 bei ,Elstar' ab 21 und bei ,Pinova' ab 42 Tagen der Lagerdauer der K-Variante signifikant höhere Werte gegenüber dem Lagerbeginn auf (Abbildung 15K, L). Die relative Genexpression von Md-ETHYLENE RESISTANT (ETR 2 war bei ,Pinova' ab 21 Tagen (Abbildung 15D) und von MdERS2 bei ,Pinova' ab 42 Tagen Lagerdauer signifikant niedriger gegenüber dem Lagerbeginn (Abbildung 15H). Die relative Genexpression von MdETR1 und Md-CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR) 1 beider Sorten (Abbildung 15A, B, I, J) sowie von MdETR2 und MdERS2 bei ,Elstar' zeigte keine Veränderung im zeitlichen Verlauf (Abbildung 15C, G).

In der K-Variante wies ,Elstar' der relativen Genexpression von MdETR1 am Tag 21 der Lagerdauer signifikant höhere Werte auf als ,Pinova'. Die relative Genexpression von MdETR2, MdERS1, MDERS2, MdCTR1 und MdERF1 wies zu keinem Zeitpunkt einen Sortenunterschied in der K-Variante auf (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der der Genexpression von MdETR1, MdETR2, MdERS1, MdERS2, MdCTR1 und MdERF1 des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Daramatar	Sorto	Lagerdauer [Tage]				
Parameter	Sorte	0	21	42		
MdETR1	,Elstar'	ns	a	ns		
	,Pinova'		b			
Mdetro	,Elstar'	nc	nc	nc		
WIGETRZ	,Pinova'	113	113	113		
	,Elstar'	nc	nc	nc		
IVIUERST	,Pinova'	115	115	115		
	,Elstar'					
IVIOERS2	,Pinova'	ns	ns	ns		
	,Elstar'					
MdCTR1	,Pinova'	ns	ns	ns		
	.Elstar'					
MdERF1	,Pinova'	ns	ns	ns		

1-MCP-Behandlung

Die relative Genexpression von MdETR2 zeigte bei beiden Sorten am Tag 21 (Abbildung 15C, D), von MdERS1 bei beiden Sorten am Tag 42 (Abbildung 15E, F) und von MdERS2 bei ,Elstar' der M1+E3-Variante signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur K-Variante auf (Abbildung 15G).

Ethylen-Behandlung

Die relative Genexpression von MdERS1 wies bei ,Elstar' am Tag 21 (Abbildung 15E) und von MdERF1 bei ,Elstar' am Tag 42 und ,Pinova' am Tag 21 der Lagerdauer der E3-Variante signifikant höhere Werte im Vergleich zur K-Variante auf (Abbildung 15K, L).



Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der Ethylenrezeptoren MdETR1 (A, B), MdETR2 (C, D), MdERS1 (E, F) und MdERS2 (G, H) sowie des Signalproteins MdCTR1 (I, J) und des Transkriptionsfaktors MdERF1 (K, L) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten ,Elstar' (A, C, E, G, I, K) und ,Pinova' (B, D, F, H, J, L) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der

K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Posthoc Test nach der Tukey-Methode berechnet worden sind. Die Berechnungen für die Genexpression von MdETR2 beruhen auf log-transformierten Daten.

4.4. Histologie

Die Messung der Anzahl der Cortexzellen und Interzellularen je mm⁻² wurde im Versuchsjahr 2012/13 durchgeführt. Da der Faktor Erntetermin zum letzten Probennahmezeitpunkt bei ,Elstar' keinen signifikanten Unterschiede in der Fruchtfleischfestigkeit aufwies und der späte Erntetermin bei ,Pinova' aufgrund eines technischen Defektes des Lagers ausfiel, wurden lediglich die Proben des frühen Erntetermin verwendet. Da die Ethylen-Varianten der 1-MCP-Behandlungen bei ,Pinova' keinen signifikanten Unterschied in der Fruchtfleischfestigkeit aufwiesen, wurden lediglich die M0-Variante und E9-Variante neben der K-Variante ausgewertet, die außerdem die größten Unterschiede in der Fruchtfleischfestigkeit zur jeweiligen K-Variante aufwiesen.

Die Anzahl der Cortexzellen je mm⁻² (Abbildung 16A) wiesen innerhalb der Sorte keinen Behandlungsunterschied auf, aber die Anzahl der Cortexzellen der K-Variante von ,Pinova' war signifikant höher als von ,Elstar'. Die Anzahl der Interzellularen je mm⁻² (Abbildung 16B) zeigten bei ,Elstar' keinen Unterschied der Behandlungen zueinander, aber bei ,Pinova' wies die E9-Variante signifikant niedrigere Werte als die K- und M0-Variante auf. Die Anzahl der Interzellularen der K-Variante von ,Pinova' wies wiederum signifikant höhere Werte als ,Elstar' auf. Die Betrachtung der Horizontalschnitte der Cortexzellen aus dem Parenchym der Apfelfrucht spiegelte diese Ergebnisse wieder. Dabei waren bei ,Elstar' größere Interzellularen als bei ,Pinova' zu erkennen bei etwa gleich großen Cortexzellen (Abbildung A. 5:A-F).



Abbildung 16: Anzahl der Cortexzellen (A) und Interzellularen (B) je mm⁻² der Sorten ,Elstar' und ,Pinova' aus dem Versuchsjahr 2012/13 nach einer Lagerdauer von 3 Monaten bei 10 °C und normaler Atmosphäre. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M0 = 1-MCP-Behandlung am Tag 0 der Lagerdauer; E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der Behandlungen innerhalb einer Sorte sind mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben versehen und zwischen der K-Variante der Sorten mit einem Stern über der Klammer.

4.5 Aktivität zellwandmodifizierender Enzyme

4.5.1 PME-Aktivität

Die Messung der Pektinmethylesterase (PME)-Aktivität, die auf der photometrischen Messung von Hagerman & Austin (1986) basiert, zeigte eine Unstimmigkeit im Verlauf der Negativkontrolle. Die Idee dieser photometrischen Messung beruht auf einer pH-Wert-Absenkung infolge der PME, die mittels eines Indikators sichtbar gemacht wird. Dementsprechend sollte der Verlauf der Messung ohne enzymatische Aktivität parallel zur Zeitachse erfolgen, da sich der pH-Wert nicht ändert und damit die Farblösung konstant bleibt. Mit enzymatischer Aktivität sollte eine abnehmende Kurve mit abflachendem Ende angezeigt werden, deren Abnahme umso steiler ist je höher die Enzymaktivität ist. Um diese Verläufe zu erhalten, wurde im ersten Schritt (Tabelle 5) der Methodenetablierung im Ansatz 1.1 zunächst geprüft, welche Konzentration der Indikatoren Bromthymolblau (BTB), dessen erster Farbumschlag im basischen Bereich liegt, und Bromkresolgrün (BKG), dessen erster Farbumschlag im sauren Bereich liegt, benötigt wurde, um im nahezu linearen Messbereich der Absorbanz von 0 bis 1 zu bleiben. Dabei stellte sich heraus, dass eine Indikatorkonzentration von 0,1 % für BTB und 0,01 % für BKG erforderlich war. Anschließend wurde in den Ansätzen 1.2 und 1.3 geprüft, ob ein stabiler Verlauf der Negativkontrolle zu erreichen ist, wenn einzelne Komponenten entweder eine pH-Einstellung erhielten oder in einer gepufferten Lösung angesetzt wurden. Dabei zeigte die pH-eingestellte (Ansatz 1.2a) bzw. in Puffer gelöste Substratlösung (Ansatz 1.3a) mit dem Indikator BKG den geforderten parallelen Verlauf und mit dem Indikator BTB eine leichte Steigung bzw. abflachende Kurve (Abbildung 17). Die Ansätze 1.2b sowie 1.3b und 1.3c zeigten ähnliche Verläufe (nicht dargestellt).

Im zweiten Schritt (Tabelle 5) wurde der Verlauf der Positivkontrolle geprüft, indem zum einen zwei verschiedene Verdünnungslösungen (Ansatz 2.1) und zum anderen unterschiedliche Konzentrationen (Ansatz 2.2) getestet wurden. Dabei zeigte sich, dass die Abnahme der in Puffer verdünnten Positivkontrolle mit dem Indikator BTB steiler war als der in der dest. Wasser verdünnten Positivkontrolle (Abbildung 17A). Gegenteilig verhielt es sich bei der Positivkontrolle mit dem Indikator BKG (Abbildung 17B). Da die in Puffer verdünnte Positivkontrolle mit dem Indikator BKG keinen deutlichen Unterschied zur Negativkontrolle aufwies, wurde für den Ansatz 2.2 die Positivkontrolle nur mit dest. Wasser verdünnt geprüft. Dabei erwies sich, dass bei der Verwendung mit dem Indikator BTB bereits eine Konzentration von 0,5 U ausreichte, um eine steile Abnahme der Kurve zu sehen (Abbildung 17A). Für eine ähnlich steile Abnahme wurde mit dem Indikator BKG die doppelte bis vierfache Konzentration benötigt (Abbildung 17B).

Im dritten Schritt (Tabelle 5) wurde ein geeignetes Extraktionsverfahren geprüft, indem zwei unterschiedliche Zustände des Probenmaterials (Ansatz 3.1), verschiedene Extraktionslösungen (Ansatz 3.2) sowie mehrmaliges Extrahieren (Ansatz 3.3) und Aufreinigen des Extraktes (Ansatz 3.4) getestet wurden. Aus keinem dieser Ansätze gelang es natives Enzym aus Apfelfruchtfleisch zu extrahieren.



Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der photometrischen Messung zur PME-Aktivität bei einer Absorbanz von 620 nm der Negativkontrolle sowie der Positivkontrolle, die sowohl in dest. Wasser als auch in Puffer gelöst sind, in Verbindung mit dem Indikator Bromthymolblau (A), dessen Farbumschlagspunkte bei pH 7,6 und 5,8 liegen, und dem Indikator Bromkresolgrün (B), dessen Farbumschlagspunkte bei pH 5,4 und 3,8 liegen.

4.5.2 GAL-Aktivität

Die Messung der β-Galaktosidase (GAL)-Aktivität wurde im Versuchsjahr 2013/14 durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Mittelwerten der Originaldaten. Zur Erfüllung der Varianzhomogenität und Normalverteilung wurden signifikante Unterschiede an Wurzel-transformierten Daten berechnet.

Unbehandelte Kontrolle

Die GAL-Aktivität der K-Variante betrug zu Lagerbeginn bei "Elstar' 5 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹ (Abbildung 18A), bei "Golden Delicious' 106 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹ (Abbildung 18C) und bei "Pinova' war diese nicht messbar (Abbildung 18B). Der signifikante Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn erfolgte bei "Elstar' am Tag 7, bei "Pinova' am Tag 28 der Lagerdauer und bei "Golden Delicious' erfolgte über die gesamte Lagerdauer kein signifikanter Anstieg. Das Maximum der GAL-Aktivität wurde bei "Elstar' am Tag 21 mit 293 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹, bei "Pinova' am Tag 70 mit 122 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹ und bei "Golden Delicious' am Tag 74 mit 149 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹.

Sortenunterschiede der K-Variante traten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Lagerung auf (Tabelle 13). Im ersten Drittel wies ,Pinova' durchgehend signifikant niedrigere Werte als ,Golden Delicious' und am Tag 7 der Lagerdauer signifikant niedrigere Werte als ,Elstar' auf. ,Elstar' wies im selben Zeitraum zu Beginn der Lagerdauer signifikant niedrigere Werte und an den Tagen 14 und 21 der Lagerdauer signifikant höhere Werte als ,Golden Delicious'. Im zweiten Drittel gab es lediglich am Tag 42 der Lagerdauer einen Sortenunterschied mit signifikant niedrigeren Werten von ,Pinova' gegenüber ,Elstar' und ,Golden Delicious'. Im letzten Drittel der Lagerdauer wies ,Elstar' signifikant höhere Werte als ,Pinova' auf.

Tabelle 13: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der GAL-Aktivität des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Sorto					Lager	dauer	[Tage]				
Sonte	0	7	14	21	28	42	56	70	84	98	112
,Elstar'	b	b	а	а		а				а	а
,Pinova'	b	а	b	b	ns	b	ns	ns	ns	b	b
,Golden Delicious'	а	b	с	b		а				ab	ab

1-MCP-Behandlung

Die GAL-Aktivität der M1+E3-Variante zeigte den signifikanten Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn bei ,Elstar' am Tag 70 (Abbildung 18A), bei ,Pinova' am 28 der Lagerdauer (Abbildung 18B) und bei ,Golden Delicious' erfolgte über die gesamte Lagerdauer kein signifikanter Anstieg (Abbildung 18C). Das Maximum der GAL-Aktivität wurde bei ,Elstar' am mit 148 μ mol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹, Tag 84 bei ,Pinova' Tag 112 mit am 124 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹ bei ,Golden 70 und Delicious' am Tag mit 156 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹.

Ethylen-Behandlung

Die GAL-Aktivität der E3-Variante zeigte den signifikanten Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn bei ,Elstar' am Tag 7 (Abbildung 18A), bei ,Pinova' am 83 der Lagerdauer (Abbildung 18B) und bei ,Golden Delicious' erfolgte über die gesamte Lagerdauer kein signifikanter Anstieg (Abbildung 18C). Das Maximum der GAL-Aktivität wurde bei ,Elstar' am Tag 14 mit 376 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹, bei ,Pinova' am Tag 83 mit 93 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹ und bei ,Golden Delicious' am Tag 29 mit 146 µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹.



Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der GAL-Aktivität [µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹] der Sorten ,Elstar' (A), ,Pinova' (B) und ,Golden Delicious' (C) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in 7-tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung der Originaldaten. Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf signifikant (p < 0,05) erhöhte Enzymaktivität in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Wert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzel-transformierten Daten.</p>

4.6 Genexpression der zellwandmodifizierenden Proteine

Die Messung der relativen Genexpression der zellwandmodifizierenden Proteine wurde im Versuchsjahr 2013/14 durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Mittelwerten der Originaldaten. Zur Erfüllung der Varianzhomogenität und Normalverteilung wurden signifikante Unterschiede in der relativen Genexpression von MdGAL sowie von Md-Polygalakturonase (PG), Md-Pektatlyase (PL), Md-Endo-Glukanase (EGase) und Md-Xyloglukan-Endotransglykosylasen/ -hydrolasen (XTH) 2 bei ,Elstar' an log-transformierten Daten und von MdXTH2 bei ,Pinova' an Wurzel-transformierten Daten berechnet.

4.6.1 Pektinmodifizierende Enzyme

Unbehandelte Kontrolle

Die relative Genexpression der K-Variante von MdPG zeigte bei ,Elstar' ab 21 und bei ,Pinova' ab 42 Tagen (Abbildung 19A, B), von MdGAL bei ,Elstar' ab 42 und bei ,Pinova' ab 21 Tagen (Abbildung 19E, F) und von Md-α-L-Arabinofuranosidase (AF) 1 bei ,Elstar' und ,Pinova' ab 42 Tagen Lagerdauer (Abbildung 19G, H) einen signifikanten Anstieg gegenüber dem Lagerbeginn. Die relative Genexpression von MdPME wies bei beiden Sorten keine Veränderung im zeitlichen Verlauf der K-Variante auf (Abbildung 19I, J). Die relative Genexpression von MdPL zeigte in der K-Variante bei ,Pinova' ab 42 (Abbildung 19D) Tagen Lagerdauer eine signifikante Abnahme gegenüber dem Lagerbeginn und bei ,Elstar' (Abbildung 19C) erfolgte erst eine

signifikante Abnahme gegenüber dem Lagerbeginn am Tag 21 und darauf wieder eine Zunahme, die nicht signifikant verschieden gegenüber dem Lagerbeginn war.

,Elstar' wies in der K-Variante in der relativen Genexpression von MdPG und MdAF1 ab 21 Tagen und von MdPL und MdGAL ab 42 Tagen Lagerdauer signifikant höhere Werte auf als die K-Variante von ,Pinova'. Die relative Genexpression von MdPME wies zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen ,Elstar' und ,Pinova' in der K-Variante auf (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der Genexpression von MdPG, MdPL, MdGAL, MdAF und MdPME des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Daramotor	Sorto	Lager	dauer [Tage]
Parameter	Sonte	0	21	42
MdDC	,Elstar'	20	а	а
MuPG	,Pinova'	115	b	b
MdPL	,Elstar' ,Pinova'	ns	ns	a b
MdGAL	,Elstar' ,Pinova'	ns	ns	a b
	,Elstar'		а	а
MdAF1	,Pinova'	ns	b	b
MdPME	,Elstar' ,Pinova'	ns	ns	ns

1-MCP-Behandlung

Die relative Genexpression der M1+E3-Variante von MdPG führte bei ,Elstar' am Tag 21 und bei MdPL am Tag 42 zu signifikant niedrigeren Werten im Vergleich zur K-Variante (Abbildung 19A, C). Die relative Genexpression von MdPL bei ,Pinova' der M1+E3-Variante wies durchgehend signifikant höhere Werte im Vergleich zur K-Variante auf (Abbildung 19D).

Ethylen-Behandlung

Die relative Genexpression von MdPL war bei ,Elstar' am Tag 21 und von MdGAL durchgehend bei ,Elstar' signifikant höher im Vergleich zur K-Variante (Abbildung 19C, E).



Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der pektinmodifizierenden Enzyme MdPG (A, B), MdPL (C, D), MdGAL (E, F), MdAF1 (G, H) und MdPME (I, J) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten "Elstar' (A, C, E, G, I) und 'Pinova' (B, D, F, H, J) über eine 6-wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Versuchsjahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Post-hoc Test nach der Tukey-Methode berechnet worden sind. Die Berechnungen für die Genexpression von MdGAL sowie MdPG und MdPL bei "Elstar' beruhen auf log-transformierten Daten.

4.6.2 Hemizellulose- und zellulosemodifizierende Proteine

Unbehandelte Kontrolle

Die relative Genexpression der K-Variante von Md-Expansin (EXP) 2 zeigte bei ,Elstar' ab 42 Tagen (Abbildung 20A), von Md-Xylosidase (XYL) bei ,Elstar' ab 21 Tagen und bei ,Pinova' ab 42 Tagen (Abbildung 20G, H) sowie von MdEGase bei ,Elstar' ab 42 Tagen Lagerdauer (Abbildung 20I) signifikant höhere Werte gegenüber dem Lagerbeginn. Die relative Genexpression von MdEXP2 und von MdXTH10 wies bei ,Pinova' ab 42 Tagen (Abbildung 20B, F) und von MdXTH2 bei ,Elstar' ab 42 Tagen (Abbildung 20C) signifikant niedrigere Werte gegenüber dem Lagerbeginn auf. Die relative Genexpression von MdXTH10 bei ,Elstar' (Abbildung 20E) und von MdEGase bei ,Pinova' (Abbildung 20J) wiesen keine zeitliche Veränderung der K-Variante auf. Die relative Genexpression von MdXTH2 bei ,Pinova' zeigte am Tag 21 der Lagerdauer eine signifikante Abnahme gegenüber dem Lagerbeginn und stieg am Tag 42 wieder auf das Niveau von Lagerbeginn an (Abbildung 20D).

In der K-Variante wies ,Elstar' der relativen Genexpression von MdEXP2 am 42. Tag, von MdXTH2 bis 21 Tage, von MdXTH10 am 21. Tag, von MdEGase am 42. Tag der Lagerdauer und von MdXYL durchgehend signifikant höhere Werte als ,Pinova' auf. ,Pinova' hatte am Tag 42 der Lagerdauer signifikant höhere Werte in der relativen Genexpression von MdXTH2 als ,Elstar' (Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnis der Varianzanalyse der unbehandelten Kontrolle (K-Variante) zum selben Tag der Lagerdauer der Genexpression von MdEXP2, MdXTH2, MdXTH10, MdXYL und MdEGase des Versuchsjahres 2013/14 während einer Lagerung bei 10 °C und normaler Atmosphäre zwischen den Sorten ,Elstar' und ,Pinova'. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind durch verschiedene Kleinbuchstaben kenntlich gemacht.

Deveneter	Conto	Lager	dauer [Tage]
Parameter	Sorte	0	21	42
	,Elstar'	20	20	а
INIUEXPZ	,Pinova'	115	115	b
MdXTH2	,Elstar'	а	а	b
	,Pinova'	b	b	а
MdXTH10	,Elstar' ,Pinova'	ns	a b	ns
	.Elstar'	а	а	а
MdXYL	,Pinova'	b	b	b
	,Elstar'			а
MdeGase	,Pinova'	ns	ns	b
1-MCP-Behandlung

Die relative Genexpression von MdEXP2 wies bei ,Elstar' am Tag 42 der Lagerdauer und von MdEGase bei ,Elstar' durchgehend der M1+E3-Variante signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur K-Variante auf (Abbildung 20A, I). Die relative Genexpression von MdXTH2 der M1+E3-Variante zeigte bei ,Elstar' am Tag 42 und bei ,Pinova' am Tag 21 der Lagerdauer signifikant höhere Werte im Vergleich zur K-Variante (Abbildung 20C, D).

Ethylen-Behandlung

Die relative Genexpression von MdEXP2 hatte bei ,Elstar' und ,Pinova' am Tag 21 (Abbildung 20A, B), von MdEGase bei ,Elstar' am Tag 21 und von MdXTH2 bei ,Elstar' am Tag 42 der Lagerdauer der E3-Variante signifikant höherer Werte als die K-Variante (Abbildung 20I, C). Die relative Genexpression von MdEXP2 bei ,Elstar' am Tag 42 und von MdXTH2 bei ,Elstar' am Tag 21 der Lagerdauer der E3-Variante wies signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur K-Variante auf (Abbildung 20A, C).



Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression der hemizellulose- und zellulosemodifizierenden Proteine MdEXP2 (A, B), MdXTH2 (C, D), MdXTH10 (E, F), MdXYL (G, H) und MdGLU (I, J) zum Referenzgen Ubiquitin der Sorten ,Elstar' (A, C, E, G, I) und ,Pinova' (B, D, F, H, J) über eine 6wöchige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Versuchsjahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte (p < 0,05) der K-Variante im zeitlichen Verlauf sind mit verschiedenen Kleinbuchstaben und der M1+E3- und E3-Variante zur K-Variante sind mit einem Stern über der eckigen Klammer versehen, die mit dem Post-hoc Test nach der Tukey-Methode berechnet worden sind. Die Berechnungen für die Genexpression von MdEGase und MdXTH2 bei ,Elstar' beruhen auf log-transformierten Daten und von MdXTH2 bei ,Pinova' auf Wurzel-transformierten Daten.

5. Diskussion

5.1 Fruchtfleischfestigkeit

Unbehandelte Kontrolle

Die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit zeigte in der K-Variante für alle Sorten den erwarteten Verlauf mit einer kurzen I. Phase für ,Elstar' und ,Golden Delicious' und einer längeren I. Phase für ,Pinova'. Damit bestätigt sich die Annahme, dass ,Elstar' und ,Golden Delicious' weichwerdende Sorten sind und ,Pinova' eine festbleibende Sorte ist. Zukünftig sollte eine einheitliche Definition für eine Einteilung der Sorten in weichwerdend und festbleibend anhand der Länge der I. Phase formuliert werden, damit Studien besser miteinander verglichen werden können.

1-MCP-Behandlung

Ebenso erwartungsgemäß zeigte sich die reifeinhibitorische Wirkung der 1-Methylcyclopropen (1-MCP)-Behandlung, indem diese die I. Phase sowohl der weichwerdenden als auch der festbleibenden Sorte verlängerte. Der erwartete Unterschied in der Fruchtfleischfestigkeit insbesondere der weichwerdenden Sorte ,Elstar' im Versuchsjahr 2012/13 bei einer zeitversetzten 1-MCP-Behandlung zwischen 1 Tag und 7 Tage nach der Ernte blieb überraschender Weise aus. Andere Studien mit einer zeitversetzten 1-MCP-Behandlung (Tatsuki *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2013) zeigten, dass die frühere 1-MCP-Behandlung gegenüber der späteren bei der weichwerdenden Sorte ,Orin' bzw. ,Cortland' (Tabelle A. 1) zu signifikant höheren Fruchtfleischfestigkeitswerten führte. Dagegen wies die festbleibende Sorte ,Fuji' bzw. ,Delicious' (Tabelle A. 1) keinen Unterschied zwischen den 1-MCP-Behandlungen auf.

Hieraus ergibt sich eine Unstimmigkeit mit den formulierten Hypothesen, dass erstens der Festigkeitstyp in Zusammenhang zur Ethylensensitivität steht und dass zweitens die Wirkung einer zeitversetzten 1-MCP-Behandlung abhängig von der Ethylensensitivität ist. Denn die weichwerdende Sorte ,Elstar' wies im Gegensatz zu den ebenfalls weichwerdenden Sorten ,Orin' und ,Cortland' keinen Unterschied der Fruchtfleischfestigkeit bei einer zeitversetzen 1-MCP-Behandlung auf. Vermutlich hängt die Effektivität einer zeitversetzten 1-MCP-Behandlung eher mit der Ethylenproduktion zusammen, denn sowohl die festbleibenden Sorten ,Pinova' und ,Fuji' als auch die weichwerdende Sorte ,Elstar' haben im Gegensatz zu ,Orin' und ,Cortland' eine geringe Ethylenproduktion. Demnach müsste die erste Hypothese dahin gehend korrigiert werden, dass nicht der Festigkeitstyp, sondern die Höhe der Ethylenproduktion einer Sorte mit der Ethylensensitivität in Zusammenhang steht. Dies trifft aber auch nicht zu, wie nachfolgend erläutert wird.

Ethylen-Behandlung

Die Behandlung mit dem Reifepromotor Ethylen sorgte nur bei 'Elstar' und 'Pinova' für die erwartete Verkürzung der I. Phase. Bei der Sorte 'Golden Delicious' lag kein Unterschied zur K-Variante vor. Damit konnte die Einteilung dieser Sorten in die Kategorien des Weichwerdens bestätigt werden: 'Elstar' zeigte eine kurze I. Phase, die durch exogenes Ethylen verkürzt wurde, damit ethylensensitiv ist und dem Typ 2 entspricht; 'Pinova' wies eine lange I. Phase auf, die trotz der Ethylenzugabe lange erhalten blieb, damit ethyleninsensitiv ist und dem Typ 3 entspricht; 'Golden Delicious' zeigte wiederum eine kurze I. Phase, die trotz zusätzlicher Ethylengabe nicht verkürzt wurde, damit ebenfalls ethyleninsensitiv ist und dem Typ 1 entspricht. Die Erklärung für die Nicht-Beeinflussung der Ethylengabe bei 'Golden Delicious', liegt in der hohen Ethylenproduktion dieser Sorte. Denn trotz permanenter Spülung der Versuchszelle mit Luft erreichte die Ethylenkonzentration innerhalb der Versuchszelle der K-Variante an mehreren Zeitpunkten der Lagerdauer über 100 µl*l⁻¹ (Abbildung A. 6). Dieser Wert war als Mindestkonzentration für die Ethylen-Behandlung angesetzt worden. Damit war die Reizschwelle der Frucht bei 'Golden Delicious' bereits überschritten und eine Zugabe von exogenem Ethylen konnte keine vermehrte Reaktion auslösen.

Die Kombinationsbehandlung von 1-MCP als Reifehemmer mit Ethylen als Reifepromotor zeigte lediglich bei ,Elstar' des frühen Erntetermins eine Verkürzung von 14 Tagen gegenüber der 1-MCP-Behandlung. Kittemann (2012) konnte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Fruchtfestigkeit von Apfelfrüchten der Sorte ,Golden Delicious' feststellen, die neben einer 1-MCP-Behandlung zusätzlich Ethylen erhielten. Somit kann die Hypothese, dass die reifehemmende Wirkung von 1-MCP durch Ethylen früher aufgehoben wird unabhängig der Ethylensensitivität einer Sorte, nicht bestätigt werden. Denn dann müssten alle Sorten eine Verkürzung zeigen. Wenn nun die zuvor korrigierten Hypothese, dass nur Sorten mit niedriger Ethylenproduktion ethylensensitiv wären, zu träfe, dann müsste neben ,Elstar' auch ,Pinova' eine verkürzte Reifehemmung der M0+E9-Variante im Vergleich zur M0-Variante zeigen.

Es bleibt die Frage, wie die Ethylensensitivität, der Festigkeitstyp und die Kategorie des Weichwerdens miteinander im Zusammenhang stehen. Um dies zu klären müssen erst die Ergebnisse der Ethylenbiosynthese sowie der Ethylensignaltransduktion diskutiert werden.

5.2 Ethylenbiosynthese im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit

Unbehandelte Kontrolle

Sowohl die Ethylenproduktion, die ACC-Oxidase (ACO)- und ACC-Synthase (ACS)-Aktivität als auch die relative Genexpression von MdACO1 und MdACS1 zeigten den erwarteten Anstieg während der Lagerdauer. Somit wurde deutlich demonstriert, dass "Elstar' und "Pinova' sich im zeitlichen Verlauf und Höhe der Ethylenproduktion, der ACO- und ACS-Aktivität ähnelten und im Vergleich zu ,Golden Delicious' deutlich geringere Mengen an Ethylen produzierten, womit bestätigt wurde, dass ,Elstar' und ,Pinova' niedrige Ethylenproduzenten sind und ,Golden Delicious' ein hoher Ethylenproduzent ist.

Die nicht-messbare ACS-Aktivität bei ,Elstar' und ,Pinova' im Versuchsjahr 2013/14 ist damit zu erklären, dass diese Früchte lediglich eine Temperatur von 10 °C hatten. Diese Fruchttemperatur setzte die Enzymaktivität so weit herab, dass die umgesetzte Menge an Ethylen unterhalb des Detektionslimits des Gaschromatographens (GC) lag. Denn die ACS-Aktivitätsmessung nach Bulens *et al.* (2011) benötigt ein Minimum von 0,22 µM ACC in der Probe, um im GC eine messbare Ethylenkonzentration zu erzeugen (Abbildung 21).



Abbildung 21: Zugabe unterschiedlicher ACC-Konzentrationen [μM] der Positivkontrolle der ACS-Aktivitätsbestimmung nach Bulens *et al.* (2011), um eine Kalibriergerade zu generieren. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 2-10) mit Standardabweichung. Der ausgefüllte Datenpunkt entspricht der standardisierten Positivkontrolle nach Bulens *et al.* (2011).

Lediglich die relative Genexpression von MdACS3 zeigte widererwarten einen konstanten Verlauf. Dies könnte daran liegen, dass der Expressionspeak von "Elstar' und "Pinova' bereits vor der Ernte lag, wie Varanasi *et al.* (2011) es auch für die Sorten "McIntosh' und "Honeycrisp' bemerkten. Zudem ergab sich unerwartet kein Sortenunterschied in der relativen Genexpression von MdACO1, MdACS1 und MdACS3. Dies ist widersprüchlich zu den Ergebnissen von Tatsuki *et al.* (2007) und Harb *et al.* (2012), die für ihre verwendeten weichwerdenden Sorten "Orin' bzw. "McIntosh' höhere MdACO1-Expressionswerte im Vergleich zu den festbleibenden Sorten "Fuji' bzw. "Honeycrisp' feststellten. Allerdings wurden in diesen Studien jeweils zwei Sorten verwendet, die die Eigenschaftskombinationen aus festbleibend mit niedriger Ethylenproduktion und weichwerdend mit hoher Ethylenproduktion aufwiesen (Tabelle A. 1). Daher ist zu vermuten, dass die Genexpression von MdACS1 und MdACO1 eher mit der Ethylenproduktion im Zusammenhang steht als mit dem Festigkeitstyp, da "Elstar' und "Pinova' eine ähnlich hohe Ethylenproduktion haben. Ein eindeutiger Bezug zur Fruchtfleischfestigkeit für die Genexpression von MdACS1 und MdASC3 konnte nicht festgestellt werden (Tatsuki *et al.*, 2007; Varanasi *et al.*, 2011; Harb *et al.*, 2012; Tan *et al.*,

2013). Trotzdem verweist die Hauptkomponentenanalyse 1 (, Abbildung 22) auf einen Zusammenhang zwischen der Genexpression von MdACS3 und der Fruchtfleischfestigkeit. Dieses Ergebnis ist irritierend, denn Varanasi et al. (2011) konnten zwar ein Muster in der relativen Genexpression von MdACS3 beobachten, das aber eher mit dem Zeitpunkt der physiologischen Reife zusammenhängt. Da ,Elstar' und ,Pinova' eher als mittelreifende Sorten zu betrachten sind, kann der Beobachtung von Varanasi et al. (2011) weder widersprochen noch zugestimmt werden. Hier könnte eine Beobachtung über mehrere Wochen vor der Ernte bei ,Elstar' und ,Pinova' lohnen, um den Zeitpunkt des Expressionsmaximums von MdACS3 ersichtlich zu machen. Weiterhin könnte man im selben Zeitraum die Expression von MdACS6 betrachten, die, wie Li et al. (2015) festgestellt haben, zum einen zeitlich vor der Expression von MdACS3 beginnt und zum anderen die Expression von MdERF2 reguliert. Dessen Protein wiederum reguliert die Expression von MdACS3 (Li et al., 2015) und MdACS1 (Li et al., 2016). Diese Ergebnisse weisen auf eine komplexe Regulation der ACS-Gene hin, die sowohl die Vorernte- als auch die Nacherntephase betreffen, und die zum jetzigen Zeitpunkt keine Schlussfolgerung zulässt, ob die Regulation der diversen ACS-Gene im Bezug zum Festigkeitstyp stehen. Bekannt ist lediglich, dass die Allel-Kombination von MdACS1 im Zusammenhang mit der Ethylenproduktion als auch der Fruchtfleischfestigkeit steht (Sunako et al., 1999; Oraguzie et al., 2004; Oraguzie et al., 2007; Zhu & Barritt, 2008; Dougherty et al., 2016). Ein Zusammenhang jener Eigenschaften mit der Allel-Kombination von MdACS3 ist dagegen umstritten (Wang et al., 2009; Dougherty et al., 2016). Apfelsorten mit der Allel-Kombination MdACS1-2/2 weisen eine geringere Ethylenproduktion als auch Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit auf im Gegensatz zu den Allelkombinationen MdACS1-1/1 oder MdACS1-1/2. Ob die Allelkombination in Einklang mit den Kategorien des Weichwerdens zu bringen ist, müsste durch eine Einteilung der Sorten in die jeweilige Kategorie, deren Allelkombination bekannt ist, geklärt werden. Zumindest für die Sorten ,Pinova', ,Fuji' und ,Golden Delicious' kann diese Einteilung erfolgen. Denn ,Pinova' und ,Fuji' entsprechen der Kategorie 3 des Weichwerdens und haben die Allelkombination 2/2 (Oraguzie et al., 2007). ,Golden Delicious' gehört zur Kategorie 1 des Weichwerdens und besitzt die ACS1-Allelkombination 1/2 (Oraguzie et al., 2004). Lediglich für die Sorte ,Granny Smith', die der Kategorie 2 des Weichwerdens angehört (Johnston et al., 2002), wird die Allelkombination widersprüchlich mit 1/1 (Sunako et al., 1999; Oraguzie et al., 2004) oder 1/2 (Sato et al., 2004; Zhu & Barritt, 2008) angegeben. Wenn sich herausstellen sollte, dass Sorten der Kategorie 2, zu der auch "Elstar' gehört, die Allel-Kombination 1/1 aufwiesen, dann würde die ACS1-Allelkombination bereits eine zuverlässige Auskunft über den Festigkeits- und Ethylenproduktionstyp sowie die Ethylensensitivität einer Sorte geben können.



Abbildung 22: Biplot der Hauptkomponentenanalyse 1 für die Variablen Fruchtfleischfestigkeit (FFF), Ethylenproduktion (Ethyl.prod.), ACO-Aktivität (ACO.Akt.) und relative Genexpression der Ethylenbiosynthese-Gene (ACO1, ACS1, ACS3) des Versuchsjahres 2013/14. Die Eigenvektoren (schwarze Pfeile) weisen die Güte der Gewichte für die Hauptkomponente 1 (PC1) und Hauptkomponente 2 (PC2) aus. Die Punkte zeigen die Verteilung der Sorte ,Elstar' (Kreise) und ,Pinova' (Dreiecke) an.

Trotz des immer wiederkehrenden Indizes der Reiferelevanz der Ethylenbiosynthese, kann kein eindeutiger Bezug zur reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme hergestellt werden. Denn die hier verwendeten Sorten oder auch in vielen anderen Studien weisen entweder eine ähnliche Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit auf, wie es hier ,Elstar' und ,Golden Delicious' tun, oder einen ähnlichen Verlauf der Ethylenproduktion, wie es hier ,Elstar' und ,Pinova' zeigen. Dies deutet daraufhin, dass Apfelsorten zum einen in einen festbleibenden oder weichwerdenden Festigkeitstyp und zum anderen in einen hohen oder niedrigen Ethylenproduzenten klassifiziert werden können. Ein Vergleich der Literatur zeigt, dass es vorrangig die Kombinationen festbleibend mit niedriger Ethylenproduktion und weichwerdend mit hoher Ethylenproduktion gibt (Abbildung 23, Tabelle A. 1). Lediglich die Sorte ,Virginia Gold' wird als festbleibend mit hoher Ethylenproduktion beschrieben (Dougherty *et al.*, 2016). Ob nun die weichwerdenden Sorten mit hoher Ethylenproduktion zur Kategorie 1 des Weichwerdens und die weichwerdenden Sorten mit geringer Ethylenproduktion zur Kategorie 2 gehören, müsste geklärt werden. Ebenso ist festzustellen, ob alle festbleibenden Sorten unabhängig ihrer Ethylenproduktion der Kategorie 3 des Weichwerdens angehören.



Abbildung 23: Anzahl der Sorten in Abhängigkeit ihres Festigkeitstyps und Höhe der Ethylenproduktion basierend auf sortenvergleichenden Studien (Saftner, 1999; Johnston *et al.*, 2001a,b; Johnston *et al.*, 2002b; Wakasa *et al.*, 2006; Oraguzie *et al.*, 2007; Tatsuki *et al.*, 2007, 2011; Wei *et al.*, 2010; Harb *et al.*, 2012; Kittemann, 2012; Ng *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; Dougherty *et al.*, 2016; Gwanpua *et al.*, 2016a, b).

Ein Beleg für den Zusammenhang zwischen Ethylenproduktion und Fruchtfleischfestigkeit zeigt deren Korrelation für den Zeitraum bis zur III. Phase (Abbildung 24). Dabei wird deutlich, dass die weichwerdenden Sorten ,Elstar' und ,Golden Delicious' eine hohe Korrelation mit r = -0,865 bzw. r = -0,911 und die festbleibende Sorte ,Pinova' mit r = -0,086 keine Korrelation aufweisen. Diese Ergebnisse sind kongruent mit denen von Gwanpua *et al.* (2016b), die in ihrer Studie die Sorten ,Jonagold' und ,Granny Smith' verwendeten. ,Jonagold' gilt als weichwerdend mit hoher Ethylenproduktion und ist damit vergleichbar mit ,Golden Delicious' und ,Granny Smith' gilt zwar als festbleibend, aber gehört wie ,Elstar' der Kategorie 2 des Weichwerdens an. Dies deutet daraufhin, dass es doch einen Zusammenhang zwischen der Fruchtfleischfestigkeit, der Ethylenproduktion und der Ethylensensitivität geben muss, der vermutlich über die Ethylenrezeptoren und nachfolgender Ethylenantwort erfolgt.



Abbildung 24: Korrelation der Fruchtfleischfestigkeit [N] gegen die Ethylenproduktion [µl*kg⁻¹*h⁻¹] von Apfelfrüchten der Sorten ,Elstar' (A), ,Pinova' (B) und ,Golden Delicious' (C) aus dem Versuchsjahr 2013/14 bei einer Lagerung von 10 C und normaler Atmosphäre. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am

dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen. Zur Berechnung der Korrelation wurde der Zeitraum bis Erreichen der III. Phase der Fruchtfleischfestigkeit jeder Sorte und Behandlung als Grundlage verwendet. Die Korrelation wurde nach der Pearson´s-Produkt-Moment-Korrelation berechnet mit dem Korrelationsmaß r.

1-MCP-Behandlung

Die Behandlung mit 1-MCP bewirkte in der Ethylenproduktion als auch in der ACO- und ACS-Aktivität unabhängig der Sorte eine zeitliche Verschiebung des Anstieges nach hinten und in der Genexpression von MdACS1 und MdACO1 die erwartete Reduzierung. Die erwartete Erhöhung der Genexpression von MdACS3 trat nur bei ,Pinova' ein, was vermutlich an dem sortenspezifischen Verlauf vor der Ernte liegt, wie bei anderen Sorten gezeigt wurde (Varanasi *et al.*, 2011; Varanasi *et al.*, 2013). Damit könnte 1-MCP ab einem bestimmten Zeitpunkt, welcher mit dem Übergang des Ethylensystems in Zusammenhang steht, auf die Genexpression von MdACS3 unwirksam werden.

Die zeitversetzte 1-MCP-Behandlung der Variante M7 zeigte unerwartet keine Auswirkung auf die Ethylenproduktion gegenüber der MO-Variante bei "Elstar' und "Pinova'. Tatsuki et al. (2007) konnten dagegen sogar zu mehreren Zeitpunkten während der Lagerdauer Unterschiede zwischen einer frühen und späteren 1-MCP-Behandlung nach der Ernte sowohl bei der festbleibenden Sorte ,Fuji' als auch der weichwerdenden Sorte ,Orin' feststellen. Damit zeigte ,Fuji' als vermeintlich ethyleninsensitive Sorte im Gegensatz zur Fruchtfleischfestigkeit eine deutliche Reaktion auf 1-MCP. Ein weiterer Unterschied in der hier durchgeführten und der von Tatsuki et al. (2007) durchgeführten Studie, ist die Lagertemperatur mit 10 °C bzw. 20 °C. Da die Früchte in dieser Arbeit vor der Messung eine Akklimatisierung an Raumtemperatur (RT; 22±2 °C) erhielten, ist der Effekt der unterschiedlichen Lagertemperatur vermutlich zu gering, um das unterschiedliche Verhalten der Sorten ,Pinova' und ,Elstar' als auch ,Fuji' und ,Orin' darauf zu begründen. Das unterschiedliche Verhalten von ,Elstar' und ,Orin' ließe sich mit einer Einteilung in die Kategorien des Weichwerdens erklären, dass ,Elstar' als Sorte der Kategorie 2 ethylensensitiv ist und damit besonders stark auf eine 1-MCP-Behandlung reagiert. ,Orin' wird vermutlich der Kategorie 1 angehören, da es dieselben Eigenschaften in Bezug auf Festigkeitstyp und Ethylenproduktion wie ,Golden Delicious' hat. Damit müsste ,Orin' ethyleninsensitiv und eine 1-MCP-Behandlung nicht wirksam sein. Allerdings müsste dieselbe Begründung dann auch für ,Fuji' und ,Pinova' funktionieren, da beide Sorten der Kategorie 3 angehören, die ebenfalls als ethyleninsensitiv gilt. Das tut es aber zumindest für 'Pinova' nicht.

Ethylen-Behandlung

Die Behandlung mit Ethylen verschob bzw. erhöhte erwartungsgemäß den Anstieg der Ethylenproduktion sowie der ACS- und ACO-Aktivität. Somit zeigten die hier verwendeten Sorten unabhängig ihrer Eigenschaftskombination eine Ethylensensitivität in Bezug auf die Ethylenbiosynthese. Die erwartete Erhöhung der Genexpression von MdACS1 und MdACO1 blieb aus. Dies könnte allerdings an den zeitlichen Abständen der Probennahme liegen, denn ein Peakverlauf der Genexpression zwischen 0 und 21 Tagen Lagerdauer deutete sich an. Eine Beeinflussung der Ethylen-Behandlung auf die Genexpression von MdACS3 ist wie erwartet nicht eingetroffen. Da es keine Studien gibt, die ähnliche Ethylen-Behandlungen in der Nacherntephase durchgeführt haben, kann das Verhalten der hier verwendeten Sorten nicht mit anderen verglichen werden.

Die Ethylen-Behandlung zusätzlich zur 1-MCP-Behandlung führte ebenso wie die Ethylen-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem früheren bzw. höheren Anstieg in der Ethylenproduktion und ACO-Aktivität. Dies zeigt, dass die reifehemmende Wirkung von 1-MCP durch Ethylen bei diesen Parametern früher aufgelöst wird. Hierbei sollte künftig geklärt werden, ab wann und welcher Dosis die Frucht wieder sensitiv für Ethylen wird und ob eine einmalige Gabe eine Induktion herbeiführt.

5.3 Ethylensignaltransduktion im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit

Unbehandelte Kontrolle

Im zeitlichen Verlauf wiesen lediglich die relativen Genexpressionen von Md-ETHYLENE RESISTANT (ETR) 1 und Md-CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE (CTR) 1 die erwartete Kontinuität bzw. die relativen Genexpressionen von Md-ETHYLENE RESPONSE SENSOR (ERS) 1 und Md-ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF) 1 die erwartete Zunahme auf. Dabei trat der Sortenunterschied in der Expression von MdERS1 und MdERF1 widererwarten nicht ein, womit ein Bezug zur reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme nicht gegeben ist. Die Annahme von Tatsuki *et al.* (2009), die das Expressionslevel von MdERS1 positiv mit dem *Shelf-life* und damit mit der Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit assoziieren, kann somit zwar nicht bestätigt werden, aber der Biplot der Hauptkomponentenanalyse 2 (Abbildung 25, Tabelle A. 3) lässt einen Zusammenhang vermuten. Wang *et al.* (2007) vermuten, dass die Genexpression von MdERF1 eher in Zusammenhang mit der Ethylenproduktion als mit dem Festigkeitstyp steht. Dies deutet auch der Biplot der Hauptkomponentenanalyse 2 an. Nicht außer Acht lassen sollte man, dass für Apfel bisher drei ERF-Gene, die in reifen Früchten exprimiert (Wang *et al.*, beschrieben wurden. Diese drei Gene werden unterschiedlich stark exprimiert (Wang *et al.*,

2007; Li et al., 2016). MdERF2 wird vergleichsweise schwach zu MdERF1 exprimiert (Wang et al., 2007), aber es wurde nachgewiesen, dass ERF2 an den Promotor von MdACS1 bindet und damit dessen Expression hemmt (Li et al., 2016). Allerdings bindet ERF2 auch an den Promotor von MdACS3, dessen Expression dadurch stimuliert wird (Li et al., 2015). ERF3 dagegen erhöht die Expression von MdACS1 durch Bindung an den Promotor, allerdings wird auch die Expression von MdERF3 durch die Bindung von ERF2 an dessen Promotor gehemmt (Li et al., 2016). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch die Signaltransduktion erfolgte Ethylenantwort in Form der ERF-Transkriptionsfaktoren wiederum eine komplizierte Regulation der Ethylenbiosynthesegene steuert, die möglichweise auch andere Gene divers regulieren. Hierbei stellt sich zum einen die Frage, welche Gene reguliert der Transkriptionsfaktor ERF1, und zum anderen, bestimmt die Expression der Transkriptionsfakoren MdERF2 und MdERF3 nur den Zeitpunkt der reifebedingten Ethylenbiosynthese oder beeinflusst es schlussendlich die Höhe der Ethylenproduktion. Wäre dem so, dann müsste das Expressions- oder Proteinniveau von ERF3 bei Sorten mit niedriger Ethylenproduktion, wie "Elstar" und "Pinova", ähnlich sein und bei Sorten mit hoher Ethylenproduktion, wie ,Golden Delicious', deutlich erhöht. Damit hätte man zwar mehr Informationen über die sortenspezifische Höhe der Ethylenproduktion, aber noch immer keinen Schluss zum Festigkeitstyp, der somit mehr auf Ebene der Ethylenrezeptoren oder der Signalweiterleitung liegen wird, wie nachfolgend gemutmaßt wird.

Auffällig ist, dass der erwartete Anstieg in der Genexpression von MdETR2 und MdERS2 nicht eintrat, sondern bei der weichwerdenden Sorte ,Elstar' konstant verlief und bei der festbleibenden Sorte ,Pinova' sogar abnahm. Dies könnte an den Zeitpunkten der Probennahme liegen, denn andere Studien beobachteten das Expressionsmaximum bereits vor (Wiersma *et al.*, 2007) oder unmittelbar nach (Tatsuki *et al.*, 2009) der Ernte. Tatsuki *et al.* (2009) beobachteten dabei ein höheres MdERS2-Expressionsniveau für die festbleibende Sorte ,Fuji' im Vergleich zur weichwerdenden Sorte ,Orin'. Der Biplot der Hauptkomponentenanalyse 2 weist ebenfalls auf einen starken Zusammenhang zur Fruchtfleischfestigkeit hin.

Bei allen Ergebnissen der Genexpression, darf nicht automatisch geschlussfolgert werden, dass auch das Genprodukt immer 1:1 vorliegt. Beispielsweise wiesen Tatsuki *et al.* (2009) nach, dass das Proteinlevel von ERS1 nicht mit dessen Genexpressionsmuster kongruent verläuft und ein deutlicher Sortenunterschied mit höheren Proteingehalten bei der festbleibenden Sorte ,Fuji' im Vergleich zur weichwerdenden Sorte ,Orin' festgestellt wurde.



Abbildung 25: Biplot der Hauptkomponentenanalyse 2 für die Variablen Fruchtfleischfestigkeit (FFF), Ethylenproduktion (Ethyl.prod.), ACO-Aktivität (ACO.Akt.) und relative Genexpression der Ethylensignaltransduktions-Gene (ETR1, ETR2, ERS1,ERS2, CTR1, ERF1) des Versuchsjahres 2013/14. Die Eigenvektoren (schwarze Pfeile) weisen die Güte der Gewichte für die Hauptkomponente 1 (PC1) und Hauptkomponente 2 (PC2) aus. Die Punkte zeigen die Verteilung der Sorte ,Elstar' (Kreise) und ,Pinova' (Dreiecke) an.

1-MCP-Behandlung

Die Behandlung mit 1-MCP führte in der relativen Genexpression von MdETR2, MdERS1 und MdERS2 zu der erwarteten Reduzierung. Dabei war eine signifikante Reduzierung der Expression von MdETR2 nur am Tag 21, der von MdERS1 nur am Tag 42 und der von MdERS2 nur bei ,Elstar' ersichtlich. Tatsuki *et al.* (2009) stellten ebenfalls für die Gene MdERS1 und MdERS2 eine Reduzierung der Expression durch 1-MCP bei der weichwerdenden Sorte ,Orin' als auch bei der festbleibenden Sorte ,Fuji' fest, allerdings wurden für die Rezeptoren ERS1 und ERS2 zum einen eine Stabilisierung des Proteingehalts und zum anderen sogar eine Erhöhung von ERS1 bei ,Orin' bemerkt. Trotzdem wies die festbleibende Sorte ,Fuji' weiterhin die höheren Proteingehalte auf. Diese Ergebnisse lassen zweierlei vermuten: Zum einen, dass nicht die Ethylensensitivität mit der Rezeptormenge von ERS1 und ERS2 in Verbindung steht, da ,Fuji' und ,Orin', die den Kategorien 3 bzw. 1 des Weichwerdens angehören, beide nicht ethylensensitiv sind. Und zum anderen, dass der Proteingehalt eher in Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit stehen könnte, was durch die Beobachtung von Wang *et al.* (2009) unterstützt wird, da die weichere ,Fuji'-Mutante ,Hirosaki Fuji' eine geringere Rezeptormenge

an ERS1 und ERS2 aufwies als ,Fuji'. Dies würde bedeuten, dass festbleibende Sorten von sich aus ein relatives hohes Niveau an ERS1- und ERS2-Rezeptoren und weichwerdende Sorten ein niedrigeres aufweisen. Durch eine Behandlung mit 1-MCP wird das Niveau dieser Rezeptoren der festbleibenden Sorte kaum verändert, aber bei weichwerdenden Sorten wird dieses erhöht, so dass die weichwerdende Sorte nun ein ähnliches Niveau wie die festbleibende aufweist und somit in einem verbesserten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit resultiert. Demnach müsste ,Pinova' höhere Proteinmengen an ERS1 und ERS2 als ,Elstar' und ,Golden Delicious' besitzen, die nach einer 1-MCP-Behandlung bei ,Elstar' und ,Golden Delicious' auf ein ähnliches Niveau wie bei ,Pinova' ansteigen sollten. Dies sollte für diese und weitere Sorten geprüft werden und auch der zeitliche Verlauf der Proteinmenge anderer Ethylenrezeptoren. Lediglich die relative Genexpression von MdETR1, MdCTR1 und MdERF1 zeigte keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle auf. Dies war zumindest für MdERF1 unerwartet. Die von Wang *et al.* (2007) beobachtete Reduzierung der Genexpression von MdERF1 erfolgte lediglich über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Ernte, daher könnte die hemmende Wirkung nach 21 Tagen Lagerdauer bereits beendet sein.

Ethylen-Behandlung

Eine Behandlung mit Ethylen führte, wie erwartet, zu keiner Veränderung in der relativen Genexpression von MdETR1 und MdCTR1. Dieses ist für CTR1 dennoch bemerkenswert, denn dessen Expression wird bei Tomate durch exogenes Ethylen erhöht, so dass deren Niveau in reifen Tomatenfrüchten höher als in unreifen ist (Klee, 2004; Gapper et al., 2013). Die Nicht-Beeinflussung durch 1-MCP oder Ethylen sowie die Konstanz im zeitlichen Verlauf der Expression von MdETR1 und MdCTR1 weisen darauf hin, dass diese Gene keine Relevanz für die Reife bei Apfel haben. Entgegen der Erwartung sorgte die Ethylenbehandlung lediglich bei MdERF1 und bei MdERS1 bei ,Elstar' zu der erwarteten höheren relativen Genexpression. Auffällig dabei ist, dass die Expressionswerte von MdERF1 bei "Elstar' am Tag 42 und bei ,Pinova' am Tag 21 der Lagerdauer signifikant erhöht waren gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die signifikant erhöhte Genexpression von MdERS1 bei "Elstar" führt im ersten Moment dazu, zu meinen, dass dies ein Indiz für die höhere Ethylensensitivität dieser Sorte gegenüber 'Pinova' sein könnte. Die Studie von Tatsuki *et al.* (2009) konnte den Zusammenhang zwischen Ethylensensitivität und ERS1-Rezeptor aber verneinen. Trotzdem gilt, dass die Ethylensensitivität negativ mit der Menge an Ethylenrezeptoren korreliert (Tieman et al., 2000; Hall & Bleecker, 2003; Kevany et al., 2007). Daher sollten ,Fuji' und ,Orin' als ethyleninsensitive Sorten (Tabelle A. 1) eine ähnlich hohe Anzahl an Ethylenrezeptoren aufweisen, was Tatsuki et al. (2009) für ERS1 und ERS2 nicht belegen konnten. Allerdings wiesen Tatsuki et al. (2009) auch nach, dass Ethylen die Rezeptormenge bei ,Fuji' reduziert und

bei ,Orin' nicht beeinflusst. Dies erklärt sich damit, dass die Behauptung, Sorten der Kategorie 1 des Weichwerdens seien ethyleninsensitiv, falsch ist. Denn dieser Typ zeigt bereits eine Reaktion auf das endogen gebildete Ethylen. Dies lässt sich zum einen über den Umkehrschluss der Reifeinhibition durch 1-MCP begründen sowie der höheren ERS1-Anzahl von ,Orin' vor Ernte im preklimakterischem Zustand (Tatsuki et al., 2009). Nach diesem Muster würde sich die Reaktion auf Ethylen für Sorten, die der Kategorie 2 des Weichwerdens entsprechen, wie z.B. ,Elstar', folgendermaßen erklären können: Sorten dieser Kategorie weisen eine relativ hohe Rezeptormenge auf, da sich die Festigkeit vorerst nicht reduziert. Deren Festigkeit jedoch durch die Zugabe von Ethylen deutlich reduziert wird und damit auch deren Rezeptormenge. Dies wäre weiterhin ein Erklärungsmodell für den Zusammenhang der Rezeptormenge mit der Fruchtfleischfestigkeit, allerdings nicht für die Ethylensensitivität der ersten beiden Kategorien. Hierfür sollte ebenfalls die Rezeptoranzahl sowie Genexpression des Rezeptors ETR2 ins Auge gefasst werden, denn dieser ist ebenfalls reiferelevant (Ireland et al., 2012) und im Gegensatz zu ERS1 und ERS2 ist bei ETR2 die Genexpression der weichwerdenden Sorte ,Golden Delicious' im Gegensatz zu der festbleibenden Sorte ,Fuji' höher (Li et al., 2010). Die vorliegenden Ergebnisse können diesen Sortenunterschied zwar nicht belegen, aber der Biplot der Hauptkomponentenanalyse 2 weist auf einen sehr starken Zusammenhang der Genexpression von MdETR2 und der Fruchtfleischfestigkeit hin. Außerdem gehört ETR2 im Gegensatz zu ERS1 und ERS2 zur Rezeptorgruppe II, welche an der ersten Einheit eine weitere transmembrane Schlaufe hat, die eine Art Signalsequenz sein soll (Shakeel et al., 2013). Nachweislich sind bei Tomate die Ethylenrezeptoren der Gruppe II wichtiger für die Ethylenantwort, denn eine reduzierte Expression von LeETR4 (Gruppe II) führt zu einer früheren und schnelleren Reife sowie einer übertriebenen Pathogenreaktion (Klee, 2004; Kevany et al., 2007). Eine Herunterregulierung von LeETR1 (Gruppe I) dagegen führt zu keiner Veränderung im Hinblick auf die Reife (Barry & Giovannoni, 2007). Des Weiteren ist die Expression von MdETR2 erst bei einer 1000 fach höheren Ethylenkonzentration signifikant erhöht im Gegensatz zur Expression von MdERS1 und MdERS2 (Ireland et al., 2014). Somit könnte ETR2 der Sensor der Ethylensensitivität in Bezug auf die Fruchtfleischfestigkeit sein und die ERS1-Menge den Ausschlag für den Festigkeitstyp geben. Demnach müsste die Rezeptormenge von ETR2 nach der Ernte bei Sorten der Kategorie 3, wie ,Pinova', niedriger sein als bei Sorten der Kategorie 2, wie ,Elstar', aber ähnlich gering sein wie bei Sorten der Kategorie 1, wie ,Golden Delicious'. Sorten der Kategorie 1 hätten nur unmittelbar vor oder zur Ernte ein hohes Maß an ETR2. Zu überprüfen gilt demnach, ob dieser Rezeptor damit eine Ausnahme der negativen Korrelation zwischen Rezeptoranzahl und Fruchtfleischfestigkeit bzw. Ethylensensitivität darstellt oder ob die Modellierung der Ethylenantwort über eine bestimmte Rezeptorkomplexierung mit ETR2 erfolgt.

5.4 Zellwandmodifizierende Proteine im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit

Unbehandelte Kontrolle

Während der Lagerdauer zeigte die relative Genexpression von Md-Polygalakturonase (PG), Md- β -Galaktisodase (GAL), Md- α -L-Arabinofuranosidase (AF) 1 und Md-Xylosidase (XYL) den erwarteten Anstieg. Obwohl die Hauptkomponentenanalyse 3 nur eine gering mehrheitliche kumulative Verteilung von 57 % hat (Tabelle A. 3), weist der Biplot (Abbildung 26) für diese Gene einen Zusammenhang zur Fruchtfleischfestigkeit aus. Die weichwerdende Sorte "Elstar" wies frühere und höhere Expressionswerte für MdPG aus als die festbleibende Sorte ,Pinova'. Dieses Muster ist kongruent mit anderen Studien (Wakasa et al., 2006; Harb et al., 2012; Ng et al., 2013). Dass PG eine essenzielle Rolle in der Fruchtfleischfestigkeit hat, wurde durch die Studie von Atkinson et al. (2012) bewiesen, in der die Fruchtfleischfestigkeit von MdPG1runterregulierten Apfelfrüchten deutlich erhöht war im Vergleich zu den Kontrollfrüchten. Allerdings ist die Regulation von MdPG noch unklar. Tacken et al. (2010) vermuten eine regulatorische Rolle des ETHYLEN INSENSITIV (EIN) 3-Transkriptionsfaktors, der ebenfalls die Transkription der ERF-Gene beeinflusst. Damit würde es einen Schluss zwischen den zellwandabbauenden Enzymen und der Ethylensignaltransduktion geben. Das gleiche Expressionsmuster wie MdPG zeigte hier die Genexpression von MdXYL. Dies ist ein Hinweis auf eine essenzielle Funktion des Enzyms XYL in der sortenspezifischen Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit bei Apfel. Da es keine ähnlichen Studien gibt, ist ein Vergleich mit anderen Apfelsorten nicht möglich. Lediglich bei Tomate ist bekannt, dass LeXYL1 mit zunehmender Reife exprimiert wird, die Expression von LeXYL2 und die Enzymaktivität dagegen mit zunehmender Reife abnehmen (Itai et al., 2003).

Auch die Expression von MdAF1 wies ein ähnliches Muster wie MdPG auf, das kongruent mit der Literatur ist (Wei *et al.*, 2010; Harb *et al.*, 2012), allerdings zeigte die Enzymaktivität von AF keinen Sortenunterschied auf (Ng *et al.*, 2015; Gwanpua *et al.*, 2016a). Bemerkenswert ist auch, dass trotz des Sortenunterschieds in der Genexpression von MdXYL und MdAF1, kein Unterschied im Gesamtgehalt des Zellwandmaterials an Xylose und Arabinose zwischen festbleibender und weichwerdender Sorte vorliegt (Ng *et al.*, 2013).



Abbildung 26: Biplot der Hauptkomponentenanalyse 3 für die Variablen Fruchtfleischfestigkeit (FFF), Ethylenproduktion (Ethyl.prod.), GAL-Aktivität (GAL.Akt.) und relative Genexpression der zellwandmodifizierenden Gene (PG, PL, GAL, AF1, PME, EXP2, XTH2, XTH10, XYL, Egase) des Versuchsjahres 2013/14. Die Eigenvektoren (schwarze Pfeile) weisen die Güte der Gewichte für die Hauptkomponente 1 (PC1) und Hauptkomponente 2 (PC2) aus. Die Punkte zeigen die Verteilung der Sorte, Elstar' (Kreise) und ,Pinova' (Dreiecke) an.

Zwar zeigte das Muster der Genexpression von MdGAL ein ähnliches wie MdPG, aber in der Literatur gibt es keine Hinweise darauf, dass die Expressionshöhe mit der Festigkeit im Zusammenhang stünde (Wei *et al.*, 2010; Harb *et al.*, 2012; Gwanpua *et al.*, 2016b). Allerdings gibt es keine Studie, die das Expressionsmuster aller 13 bekannter MdGAL-Gene in der Nacherntephase untersucht hat (Yang *et al.*, 2018), so dass es möglich ist, das bisher die Expression des falsche Gens gemessen wurde. Für die GAL-Aktivität dagegen werden in der Literatur höhere Werte für weichwerdende Sorten genannt (Wei *et al.*, 2010; Gwanpua *et al.*, 2016a). Auch die hier dargestellten Ergebnisse der GAL-Aktivität zeigten zwar den erwarteten Anstieg für ,Elstar' und ,Pinova' mit höheren Werten und einem früheren Anstieg bei ,Elstar'. Aber die weichwerdende Sorte ,Golden Delicious' wies weder einen Anstieg der GAL-Aktivität während der Lagerdauer auf noch höhere Werte als ,Pinova'. Damit zeigte sich für ,Elstar' sowohl eine Zunahme der Genexpression als auch der Aktivität von GAL im zeitlichen Verlauf bei gleichzeitiger Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit. Für ,Pinova' ergab sich keine bzw. eine spätere Veränderung bei gleichzeitig konstanten Werten der Fruchtfleischfestigkeit. Die Korrelation der Fruchtfleischfestigkeit gegen die GAL-Aktivität (Abbildung 27) dagegen verweist auf keinen positiven Zusammenhang weder bei den weichwerdenden Sorten ,Elstar' und ,Golden Delicious' noch bei der festbleibenden Sorte ,Pinova'. Somit unterstützen diese Ergebnisse nicht die allgemeine Meinung von der Bedeutung der GAL im Zusammenhang mit der reifebedingten Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit. Auf der anderen Seite könnte es sein, dass nicht das Enzym sortenspezifisch agiert, sondern dessen Substrat. Zum einen könnte eine unterschiedliche Menge an Galaktose in den jeweiligen Sorten vorhanden sein oder dessen Verfügbarkeit, also die Art und Weise wie Galaktose in der Zellwand eingebaut ist, sortenspezifisch sein. Ng et al. (2013, 2015) können zwar für die festbleibende Sorte "Scifresh" höhere Galaktose-Gehalte als für die weichwerdende Sorte ,Royal Gala' im Gesamtzellwandgehalt nachweisen konnten, allerdings wies ,Royal Gala' gleichzeitig auch eine höhere GAL-Aktivität und mehr GAL-Protein auf (Ng et al., 2015). Dies ist ein Beleg sowohl für eine sortenspezifische Enzymaktivität als auch für sortenspezifische Substratgehalte. Um die Substratverfügbarkeit aber besser einschätzen zu können, sollten die Gehalte verschiedener Zellwandfraktionen betrachtet werden. Dabei sollte in festbleibenden Sorten wenig verfügbare Galaktose in den leichter löslichen Fraktionen und vermehrt in schwerer löslichen Fraktionen vorkommen. Ng et al. (2015) wiesen für Galaktoseketten nach, dass diese in schwerlöslichen Zellwandfraktionen der festbleibenden Sorte ,Scifresh' mehr vorhanden waren als in der weichwerdenden Sorte ,Royal Gala'. Somit müssten ,Elstar' und ,Golden Delicious' eine ähnliche Verteilung der Galaktose in den Zellwandfraktionen sowie höhere Gehalte in den leichter löslichen Fraktionen aufweisen als ,Pinova'. Das Beispiel von Galaktose zeigt, dass die Gesamtgehalte in der Zellwand nur bedingt eine Aussage zum Festigkeitstyp zulassen. Daher ist die Bestimmung der Substratgehalte in verschiedenen Zellwandfraktionen aufschlussreicher als Enzymaktivitätstests oder Genexpressionsanalysen, insbesondere für Enzyme, die ein spezifisches Produkt hinterlassen, wie es für XYL, AF und GAL der Fall ist.



Abbildung 27: Korrelation der Fruchtfleischfestigkeit [N] gegen die GAL-Aktivität [µmol PNP*100 mg TS⁻¹*h⁻¹] von Apfelfrüchten der Sorten ,Elstar'(A), ,Pinova' (B) und ,Golden Delicious' (C) aus dem Versuchsjahr

2013/14 bei einer Lagerung von 10 C und normaler Atmosphäre. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils die Mitte des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in 7-tägigen Abständen. Zur Berechnung der Korrelation wurde der Zeitraum bis Erreichen der III. Phase der Fruchtfleischfestigkeit jeder Sorte und Behandlung als Grundlage verwendet. Die Korrelation wurde nach der Pearson´s-Produkt-Moment-Korrelation berechnet mit dem Korrelationsmaß r.

Die relative Genexpression von Md-Pektatlyase (PL) zeigte im Gegensatz zur Expression von MdPG nicht die erwartete Zunahme. Auch der erwartete Sortenunterschied mit höheren Werten bei der weichwerdenden Sorte ,Elstar' tritt erst am Tag 42 der Lagerdauer auf. Auch Harb *et al.* (2012) beobachteten bei der weichwerden Sorte ,McIntosh' eine Abnahme und bei der festbleibenden Sorte ,Honeycrisp' eine gleichbleibend niedrige Expression während der Nachlagerung von 10 Tagen. Die Genexpression von MdPL steht demnach nicht mit der reifebedingten Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit in Verbindung. Allerdings ist eine konstante Enzymaktivität während der Nacherntephase von PL vorhanden (Goulao *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2011a, 2011b). Anhand dieser Ergebnisse ist eine eindeutige Rolle von PL in der reifebedingten Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit nicht zu bemessen. Zumal es noch keine Studie gibt, die ein oder mehrere Gene von PL bei Apfel als definitiv reiferelevant herausgearbeitet hat, wie es für Tomate gezeigt wurde, dessen Gen SIPL als einziges von 22 Genen als reiferelevant identifiziert wurde und dessen Expression in negativem Zusammenhang zur Fruchtfleischfestigkeit steht (Yang *et al.*, 2017).

Entgegen der Erwartung verlief die relative Genexpression von Md-Xyloglukan-Endotransglykosylase/ -hydrolase (XTH) 2 und 10 sowie Md-Endo-Glukanase (EGase) und Md-Expansin (EXP) 2. Die Genexpression von MdXTH2 und 10 sollte einen Anstieg während der Lagerdauer verzeichnen, was bei beiden Sorten nicht erfolgte. Harb et al. (2012) dagegen maß eine Zunahme nach Ernte des Gens MdXTH2 bei der weichwerdenden Sorte, McIntosh' sowie eine Zunahme nach Ernte des Gens MdXTH10 bei der festbleibenden Sorte ,Honeycrisp'. Dafür konnte hier der erwartete Sortenunterschied ist jeweils mit höheren Werten für die weichwerdende Sorte ,Elstar' im Vergleich zur festbleibenden Sorte ,Pinova' festgestellt werden. Kittemann (2012) dagegen stellte für MdXTH2 bei denselben Sorten ein gegenteiliges Ergebnis fest. Harb et al. (2012) wiederum fanden für MdXTH2 ein höheres Niveau der weichwerdenden Sorte ,McIntosh' gegenüber der festbleibenden Sorte ,Honeycrisp' und für MdXTH10 dagegen ein höheres Niveau bei ,Honeycrisp'. Ob diese teils widersprüchlichen Ergebnisse lediglich an den Lagerbedingungen bzw. Zeitpunkten der Probennahme liegt, ist nicht zu bestimmen und somit ist ein Bezug der Genexpression von MdXTH2 und MdXTH10 zur Festigkeit nicht einschätzbar. Auch die Genexpression von MdEGase wies lediglich für "Elstar" am Tag 42 der Lagerdauer deutlich erhöhte Werte auf, die auch nur für diesen Zeitpunkt einen

Sortenunterschied hervorbrachte. Auch für dieses Gen findet man in der Literatur kaum Studien, die sowohl eine zeitlichen Verlauf nach der Ernte abdecken als auch mehrere Sorten verwenden. Für den Verlauf der MdEGase-Expression bei Apfel wiesen lediglich Goulao et al. (2008) für den Zeitraum von Fruchtansatz bis Überreife nur für ersteren eine erhöhte Genexpression aus. Li et al. (2010) konnten vor der Ernte einen Peak für die festbleibende Sorte ,Fuji' zeigen, bei gleichzeitig konstant niedriger Expression von ,Golden Delicious'. Der Biplot der Hauptkomponentenanalyse 3 weist allerdings auf einen Zusammenhang zwischen Expression und Fruchtfleischfestigkeit hin. Bei näherer Betrachtung fällt die deutlich erhöhte Expression von "Elstar" in dem Zeitraum der vorangeschrittenen II. Phase der Fruchtfleischfestigkeit auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nun das Hemizelluloseund Zellulosenetzwerk frei liegt, so dass dieses Enzym seine Arbeit aufnehmen kann. Diese Vermutung wird durch die Studie von Ortiz et al. (2011a) gestützt, die eine höhere Enzymaktivität nach mehrwöchiger Lagerung für die ULO-gelagerten Früchte im Gegensatz zu den kühl gelagerten Früchten belegten. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass Cybulska et al. (2013) mittels Atomkraftmikroskopie (engl. "atomic force microscopy" (AFM)), die die Nanostruktur der Zellwand abbilden kann (Paniagua et al., 2014), zeigen konnten, dass Apfelsorten mit dickeren Zellulosemikrofibrillen eine höhere Fruchtfleischfestigkeit aufweisen. Da das Enzym EGase kürzere Glukoseketten produziert, lässt sich das Produkt der EGase-Aktivität nicht spezifisch messen. Eine indirekte Möglichkeit EGase-Aktivität zu bestimmen, kann über eine Verringerung des Molekulargewichts des Zellwandmaterials von pektinfreien Zellwandextraktionen erfolgen. Solch eine Verringerung stellen zwar Ng et al. (2015) und Ortiz et al. (2011b) fest, aber ein Zusammenhang zum Festigkeitstyp ist nicht ersichtlich (Ng et al., 2015). Damit schein EGase eine Rolle in der reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme zu haben, deren Bedeutung zur Zeit nicht eingeschätzt werden kann. Die relative Genexpression von MdEXP2 zeigte zwar für ,Elstar' die erwartete Zunahme während der Lagerdauer, dagegen nahm die Genexpression bei ,Pinova' ab, was auch erst am Tag 42 der Lagerdauer zum erwarteten Sortenunterschied führte. Mehrere Studien belegen zwar die Expression von MdEXP2 in reifen Früchten (Harb et al., 2012; Trujillo et al., 2012; Ireland et al., 2014), aber auch eine Expression von MdEXP3 (Wakasa et al., 2006; Goulao et al., 2008; Trujillo et al., 2012; Ireland et al., 2014). Für beide Gene wird eine höhere Expression in weichwerdenden Sorten beobachtet (Wakasa et al., 2006; Harb et al., 2012), allerdings existiert keine sortenvergleichende Studie, die beide Gene untersucht, womit fraglich bleibt, welches dieser Gene im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme steht. Der Biplot der Hauptkomponentenanalyse 3 indiziert einen Zusammenhang der Genexpression von MdEXP2 mit der Ethylenproduktion. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Genexpression eher durch die reifebedingte Ethylenproduktion beeinflusst wird als mit der reifebedingten

Fruchtfleischfestigkeitsabnahme in Verbindung zu stehen. Diese Vermutung wird gestützt, da die bei Harb et al. (2012) und Wakasa et al. (2006) verwendeten Sorten nur die Kombination festbleibend mit geringer Ethylenproduktion und weichwerdend mit hoher Ethylenproduktion aufwiesen. Um den Bezug zu reifebedingten Prozessen herstellen zu können, sollte die Genexpression von MdXTH2, MdXTH10, MdEGase sowie MdEXP2 in einer Vergleichsstudie mit mehreren Sorten, die jeder Festigkeits- und Ethylenproduktionskombination entsprechen, gemessen werden. Darüber hinaus sollte auch die Enzymaktivität von XTH und EGase sowie der Proteingehalt von EXPA gemessen werden, um den Einfluss dieser Proteine auf die Fruchtfleischfestigkeit bei festbleibenden und weichwerdenden Sorten einschätzen zu können. Die relative Genexpression von Md-Pektinmethylesterae (PME) zeigte weder den erwarteten Anstieg während der Lagerung noch den erwarteten Sortenunterschied. Entgegen der Beobachtung von Wei et al. (2010) konnten Gwanpua et al. (2016b) keine Korrelation zwischen Genexpression und Fruchtfleischfestigkeit ausmachen, obwohl ,Granny Smith' als festere Sorte zum Zeitpunkt der Auslagerung eine höhere Genexpression von MdPME1 aufwies als die weichere Sorte ,Jonagold'. Um den Einfluss der PME-Aktivität auf die reifebedingte Fruchtfleischfestigkeitsabnahme einordnen zu können, stellte sich heraus, dass die hier verwendete photometrische Methode nicht geeignet war, denn zum einen ließ sich der geforderte Verlauf der Negativkontrolle nicht erreichen und zum anderen lieferte die Extraktion kein natives Enzym. Daher sollten Studien zur Bewertung der reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme durch PME-Aktivität den Vorzug gegeben werden, die das spezifische Produkt der PME, Methanol, messen, wie beispielsweise bei Ng et al. (2013). Studien, die eine unspezifische Messung, wie die pH-Wert-Veränderung, verwendet haben, sind eher kritisch zu betrachten, wie beispielsweise bei Wei et al. (2010) oder Gwanpua et al. (2014). Dabei konnten Ng et al. (2013) keine unterschiedliche PME-Aktivität ab Erntereife zwischen der festbleibenden Sorte "Scifresh' und der weichwerdenden Sorte "Royal Gala" feststellen. Da die Aktivität des Enzyms PME Veränderungen in der Zellwandstruktur zur Folge hat, könnte wiederum nicht das Enzym selbst sondern die Veränderungen am Substrat Hinweise auf einen sortenspezifischen Unterschied in der Fruchtfleischfestigkeit liefern. Betrachtet man die Menge an hoch- und niedrigmethyliertem Homogalakturonan (HG) sowie den Grad der Methylierung (DM) des HGs von festbleibenden und weichwerdenden Sorten, konnte kein Unterscheid ausgemacht werden (Ng et al., 2013; Gwanpua et al., 2016a). Aber für die Anzahl an Eggbox-Strukturen konnten Ng et al. (2013) mehr bei ,Scifresh' als bei ,Royal Gala' feststellen. Da sich Eggbox-Strukturen nur bei ausreichender Kalzium-Verfügbarkeit der Frucht ausbilden können, die wiederum von anderen Faktoren beeinflusst wird (Hocking et al., 2016), müsste hier weitergehend geprüft werden, ob die Anzahl der Eggbox-Strukturen ein sortenspezifisches Merkmal für den Festigkeitstyp ist oder dies ein zufälliger Effekt war.

1-MCP-Behandlung

Die erwartete hemmende Wirkung von 1-MCP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf die relative Genexpression konnte nur bei MdEXP2 und MdPG der weichwerdenden Sorte ,Elstar' beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von Wakasa et al. (2006) und Kittemann (2012) überein. Die relative Genexpression von MdEGase zeigte am Tag 42 der Lagerdauer bei "Elstar" signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies könnte wie bei MdPG daraufhin deuten, dass dieses Gen bzw. das Enzym, für das kodiert, ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der reifebedingten es Fruchtfleischfestigkeitsabnahme hat. Dagegen zeigte die 1-MCP-Behandlung in der relativen Genexpression von MdGAL, MdAF1, MdPME und MdXYL keine Veränderung zur unbehandelten Kontrolle. Dabei belegen mehrere Studien für die Expression von MdGAL (Wei et al., 2010; Gwanpua et al., 2016b), MdAF1 (Mann et al., 2008; Wei et al., 2010; Storch et al., 2015) und MdXYL (Kittemann, 2012) eine hemmende Wirkung. Die fehlende Übereinstimmung mit den hier dargestellten Ergebnissen könnte an den weiten Zeitpunkten der Probennahme liegen. Allerdings sollte die hemmende Wirkung von 1-MCP, sofern diese Gene mit der reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme in Zusammenhang stehen, mindestens bis zu einer Lagerdauer von 21 Tagen andauern, da die Fruchtfleischfestigkeit der 1-MCPbehandelten Früchte selbst bei "Elstar' bis zum 42. Tag der Lagerdauer in der I. Phase bleiben. Auch die GAL-Aktivität der 1-MCP-behandelten Früchte zeigte nur bei "Elstar" den erwarteten späteren Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Verlauf korreliert auch mit der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme (r = -0,756) (Abbildung 27). Bei den Sorten ,Pinova' und Delicious' dagegen die Korrelation zwischen GAL-Aktivität ,Golden ist und Fruchtfleischfestigkeit mit einem Bestimmtheitsmaß von r = 0,144 bzw. r = -0,208 nur schwach vorhanden (Abbildung 27). Wei et al. (2010) dagegen beobachteten eine deutliche Hemmung der GAL-Aktivität von 1-MCP-behandelten Früchten bei der festbleibenden Sorte ,Fuji' und der weichwerdenden Sorte ,Golden Delicious'. Dies könnte daran liegen, dass die Äpfel bei Wei et al. (2010) bei RT lagerten und die hier verwendeten Früchte bei 10 °C, so dass der Temperaturunterschied der Früchte diesen Effekt auf die unerwartet fehlende verringerte GAL-Aktivität erklärt.

Auffällig ist die Genexpression von MdPL, MdXTH2 und 10 der 1-MCP-behandelten Früchte. Entgegen der Erwartung wies die Expression von MdPL bei "Elstar' am Tag 21 der Lagerdauer keinen Unterschied zu unbehandelten Kontrolle und bei "Pinova' sogar signifikant erhöhte Werte auf. Dies indiziert, dass die Genexpression von MdPL nicht mit der reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme assoziiert ist. Die relative Genexpression von MdXTH2 zeigte bei beiden Sorten höhere Werte als die unbehandelte Kontrolle, die allerdings bei "Elstar' am

Tag 42 und bei ,Pinova' am Tag 21 der Lagerdauer signifikant verschieden waren. Dagegen zeigte die relative Genexpression von MdXTH10 bei beiden Sorten keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle auf. Diese Ergebnisse werden für die Expression von MdPL und MdXTH10 bei ,Pinova' von Kittemann (2012) geteilt. Da es keine weiteren Studien zu dem Einfluss von 1-MCP auf diese Gene gibt, kann keine Einschätzung eines Einflusses auf die sortenspezifische Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit vorgenommen werden.

Ethylen-Behandlung

Die erwartete Erhöhung der relativen Genexpression durch eine Ethylen-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle trat in der Expression von MdPL, MdGAL, MdEXP2 und MdEGase ein. Allerdings trat diese Erhöhung nur bei "Elstar' mit der Ausnahme von MdEXP2 ein, da ist auch die Expression bei ,Pinova' erhöht. Ob dies ausschließlich an der höheren Ethylensensitivität von "Elstar' liegt oder die weiten Abstände zu einer irrtümlichen Interpretation verleiten, ist nur zu vermuten, da es keine weiteren sortenvergleichenden Studien mit einer Ethylen-Behandlung in der Nacherntephase gibt, außer für GAL (Wei et al., 2010). Wei et al. (2010) beobachteten sowohl bei der festbleibenden Sorte ,Fuji' als auch der weichwerdenden Sorte, Golden Delicious' keine Auswirkung der Ethylen-Behandlung auf die Expression von MdGAL, jedoch eine erhöhte Enzymaktivität. Diese Ergebnisse stehen teilweise im Kontrast zu den hier gemachten Beobachtungen, dass die Expression der weichwerdenden Sorte ,Elstar' erhöht ist, aber nicht von der festbleibenden Sorte ,Pinova'. Auch die Enzymaktivität ist lediglich bei ,Elstar' erhöht, nicht aber bei ,Pinova' oder ,Golden Delicious'. Um diese Unstimmigkeit zu klären, müsste ein Experiment mit mehreren Sorten unter denselben Bedingungen durchgeführt werden und weitere Parameter, wie z.B. der Substratgehalt, bestimmt werden.

Dass die relative Genexpression von MdPG, MdAF, MdPME sowie MdXTH2, MdXTH10 und MdXYL keine Erhöhung aufwies, könnte entweder an den Probennahmezeitpunkten liegen, so dass der Anstieg bereits vor dem 21. Tag der Lagerdauer war, oder an einer fehlenden Ethylenabhängigkeit. Zumindest für MdPG ist ersteres zu vermuten, denn zum einen konnten Ireland *et al.* (2014) nachweisen, dass Ethylen essenziel für die Expression ist, und zum anderen zeigten Wei *et al.* (2010), dass die Expression der Ethylen-Behandlung bereits am 14. Tag nach Ernte höhere Werte als die unbehandelten Kontrolle hatte.

5.5 Histologie im Zusammenhang mit der Fruchtfleischfestigkeit

Die Ergebnisse der Histologie zeigten zwar den erwarteten Sortenunterschied mit mehr Cortexzellen bei der festbleibenden Sorte ,Pinova' im Gegensatz zur weichwerdenden Sorte ,Elstar', allerdings war auch die Anzahl der Interzellularen bei ,Pinova' höher. Erklärt werden kann dies damit, dass bei ,Pinova' viele sehr kleine Interzellularen vorliegen. Dies würde aber bedeuten, dass bei ,Elstar' wenige sehr große Interzellularen sein müssten. Die histologischen Schnitte (Abbildung A. 5) indizieren dieses, aber eine quantitative Bestätigung ist anhand dieser Schnitte schwierig. Auch die 1-MCP-Behandlung, die bei ,Elstar' zu höheren Fruchtfleischfestigkeitswerten führte, trug zu keinem Unterschied in der Anzahl der Interzellularen bei. Umgekehrt sollte bei ,Pinova' die Ethylen-Behandlung, die zu einem signifikant niedrigeren Festigkeitswert gegenüber der Kontrolle führte, in der Anzahl der Interzellularen höhere Werte aufweisen. Diese Ergebnisse und die mittelstarke Korrelation dieser histologischen Parameter gegen die Fruchtfleischfestigkeit (Abbildung 28) indizieren, dass die Fruchtfleischfestigkeit nicht von der Zellarchitektur, die u.a. durch die Größe und Anzahl der Cortexzellen und Interzellularen beschrieben wird, beeinflusst wird. Damit kann der in der Literatur angegebene Trend, dass Apfelsorten mit weicherem Fruchtfleisch zu größeren Cortexzellen und Interzellularen neigen, so dass die Zelldichte des Cortex geringer ist (Johnston *et al.*, 2002; Allan-Wojtas *et al.*, 2003; Dong & Song, 2004; McAtee *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2013), nicht bestätigt werden.



Abbildung 28: Korrelation der Anzahl der Zellen und Interzellularen je mm⁻² gegen die Fruchtfleischfestigkeit der Sorten "Elstar" und "Pinova" nach einer Lagerdauer von 3 Monaten bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Die Berechnung der Korrelation erfolgte nach der Pearson's Produkt-Moment-Korrelation mit dem Korrelationskoeffizienten r.

6. Fazit

Um die Ursache der sortenspezifischen Fruchtfleischfestigkeitsabnahme und der Ethylensensitivität einiger Apfelsorten zu ergründen, wurde anhand der reifehemmenden Behandlung mit 1-MCP und der reifefördernden Behandlung mit Ethylen sowie den drei Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious', die unterschiedlichen Festigkeitstypen und Ethylenproduzenten entsprechen, einige Parameter geprüft und diskutiert, die vermutlich im Zusammenhang mit der reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme stehen. Dabei wurde betrachtet, wie sich diese reiferelevanten Parameter im zeitlichen Verlauf der unbehandelten Kontrolle veränderten, welchen Einfluss die Behandlung darauf hatte und ob sich diese Parameter hinsichtlich der Sorteneigenschaft Festigkeit unterschiedlich verhielten (Abbildung 16). Es zeigte sich, dass die Dauer bis zur signifikanten Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit mindestens in die zwei Klassen schnell weichwerdend und lange festbleibend einzuteilen ist, sowie die Höhe der Ethylenproduktion der Sorten ebenfalls mindestens in die zwei Klassen hoch und niedrig eingeordnet werden kann. Dies führt zu 4 Kombinationsmöglichkeiten dieser Eigenschaften, von denen gesichert drei vorliegen. Dabei entsprechen die Sorten ,Elstar', ,Pinova' und ,Golden Delicious' den Eigenschaftskombinationen weichwerdend und niedrig, festbleibend und niedrig sowie weichwerdend und hoch. Weiterhin zeigte sich, dass lediglich bei der Sorte ,Elstar' eine Ethylensensitivität durch eine verfrühte oder verstärkte Wirkung der Ethylenbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sichtbar wurde. Trotzdem muss es eine Verbindung zwischen Ethylenbiosynthese und der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme bei anderen Sorten geben, da eine starke Korrelation zwischen Fruchtfleischfestigkeit und Ethylenproduktion auch bei anderen weichwerden Sorten belegt wurde. Obwohl die Expression der Ethylenbiosynthesegene auf keinen Unterschied zwischen festbleibenden und weichwerdenden Sorten hindeutete, gibt es Hinweise, dass die Allelkombination von MdACS1 einen Bezug zur Fruchtfleischfestigkeit und möglicherweise auch zur Ethylensensitivität hat. Auch die Expression der Ethylenrezeptoren wies zwar teilweise eine Veränderung über die Zeit auf, aber keinen Sortenunterschied. Damit kann das Expressionsmuster der Ethylenrezeptoren keinen Hinweis auf den Festigkeitstyp geben, hängt vermutlich aber mit Höhe der Ethylenproduktion zusammen. Allerdings scheint die Menge an Ethylenrezeptoren, die nicht mit dem Expressionsniveau kongruent ist, mit der sortenbedingten Fruchtfleischfestigkeit in Beziehung zu stehen und vielleicht sogar mit der Ethylensensitivität. Somit könnte die Ursache der sortenspezifischen und reifebedingte Fruchtfleischfestigkeitsabnahme zum einen in der ACS1-Allelkombination und zum anderen in der Anzahl der Ethylenrezeptoren liegen. Die

Ethylensensitivtät dagegen könnte lediglich durch die Anzahl des Ethylenrezeptors ETR2 gesteuert werden.

Von den bekannten zellwandmodifizierenden Enzymen ist nur die Genexpression von MdPG eindeutig mit der Fruchtfleischfestigkeit korreliert. Bei anderen Genen wie MdAF1, MdGAL, MdXYL und MdEXP2 scheint zwar ebenfalls ein reifebedingter Zusammenhang nachgewiesen zu sein, aber deren Enzymaktivität bzw. Proteinmenge lässt sich nicht mit der Eigenschaften Festigkeit oder Ethylenproduktion der Sorten verknüpfen, so dass deren Einfluss auf die sortenspezifische Fruchtfleischfestigkeitsabnahme weiterhin unklar bleibt. Möglich ist auch, dass nicht die Enzyme selbst sich sortenspezifisch verhalten, sondern die jeweilige Substratverfügbarkeit sortenspezifisch ist. Weiterhin fraglich bleibt die Rolle der Gene MdPL, MdEGase sowie MdXTH2 und 10, denen hier keine eindeutige Reife- oder Sortenrelevanz zugeschrieben werden konnte und über die es zu wenige Studien gibt, als dass eine abschließende Einschätzung möglich wäre. Im Gegensatz dazu konnte belegt werden, dass weder die Genexpression noch die Enzymaktivität von PME im Zusammenhang mit der reifebedingten Fruchtfleischfestigkeitsabnahme steht. Möglichweise könnte die Anzahl der Eggbox-Strukturen, die erst durch PME-Aktivität entstehen, einen Einfluss auf die sortenspezifische Fruchtfleischfestigkeit haben. Ebenso ohne Relevanz für die reifebedingte Fruchtfleischfestigkeitsabnahme zeigte sich die Zellarchitektur des Cortexes. Somit konnte auf Ebene der zellulären Veränderung keine eindeutige Ursache für die sortenspezifische Fruchtfleischfestigkeitsabnahme ausgemacht werden.

Schlussendlich konnten die aufgestellten Hypothesen nur partiell bestätigt werden. Die reiferelevanten Parameter verändern sich zwar bei weichwerdenden Sorten früher bzw. stärker als bei festbleibenden Sorten, allerdings konnte die Ethylensensitivität als Ursache dafür nicht bestätigt werden. Die reifehemmende Wirkung von 1-MCP konnte auch noch zu einem späteren Behandlungszeitraum festgestellt werden, allerdings ist die Abhängigkeit zur Ethylensensitivität nicht belegt worden. Die Zugabe von Ethylen verkürzte die reifehemmende Wirkung von 1-MCP, allerdings führt es bei ethylensensitiven Sorten nur teilweise zu einem einen veränderten Verlauf.

Tabelle 16: Übersicht der Übereinstimmung, der in Kapitel 2 formulierten Hypothesen (Hypo.) mit den dargestellten und diskutierten Ergebnissen (Erg.) der Veränderung einer Apfelfrucht im zeitlichen Verlauf nach der Ernte und nach einer Behandlung mit 1-MCP oder Ethylen sowie der Unterschied zwischen weichwerdender (weich) und festbleibender (fest) Apfelsorte auf die reiferelevanten Parameter Fruchtfleischfestigkeit, Ethylenproduktion, Enzymaktivität und Genexpression. ↓ = nimmt ab/ist geringer; ↑ = steigt an/ist höher; — = ist unverändert/besteht kein Unterschied; ✓ = Übereinstimmung; × = keine Übereinstimmung; ~ = nicht einheitlich/eindeutig; nb = nicht bewertbar.

Reiferelevanter	Zeitl.			Sorte			Behandlung			
Parameter	Verlauf		weich	weich fest		1-MCP		Ethylen		
	Нуро.	Erg.	Нур	Нуро.		Нуро.	Erg.	Нуро.	Erg.	
Fruchtfleischfestigkeit	\checkmark	✓	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
Ethylenproduktion	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\downarrow	~	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\checkmark	
ACS-Aktivität	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\downarrow	~	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\checkmark	
ACO-Aktivität	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	~	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\checkmark	
MdACS1-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\downarrow	×	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	
MdACO1-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\downarrow	×	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	
MdACS3-Expression	\checkmark	×	\checkmark	\uparrow	×	\uparrow	\checkmark	_	\checkmark	
MdETR1-Expression	_	\checkmark	_	-	\checkmark	_	\checkmark	_	\checkmark	
MdETR2-Expression	\uparrow	×	\uparrow	\downarrow	×	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	
MdERS1-Expression	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	
MdERS2-Expression	\uparrow	×	\checkmark	\uparrow	×	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	
MdCTR1-Expression	_	\checkmark	_	-	\checkmark	_	\checkmark	_	\checkmark	
MdERF1-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\downarrow	×	\checkmark	×	\uparrow	\checkmark	
PME-Aktivität	\checkmark	nb	\uparrow	\checkmark	nb	\checkmark	nb	—	nb	
GAL-Aktivität	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	×	\checkmark	~	\uparrow	~	
MdPG-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\uparrow	×	
MdPL-Expression	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdGAL-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdAF1-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdPME-Expression	\uparrow	×	\uparrow	\checkmark	×	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdEXP2-Expression	\uparrow	~	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\uparrow	\checkmark	
MdXTH2-Expression	\uparrow	×	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdXTH10-Expression	\uparrow	×	\uparrow	\checkmark	×	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdXYL-Expression	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	×	\uparrow	×	
MdEGase-Expression	\uparrow	~	\uparrow	\checkmark	\checkmark	\checkmark	~	\uparrow	~	
Anzahl Cortexzellen	—	nb	\checkmark	\uparrow	\checkmark	—	\checkmark	—	\checkmark	
Anzahl Interzellularen	\uparrow	nb	\uparrow	\downarrow	×	\checkmark	×	\uparrow	×	

7. Ausblick

Ausblickend sollte erst einmal eine einheitliche Definition für die Einteilung der Sorten in den Festigkeitstyp anhand der Länge der I. Phase erfolgen. Ebenso wichtig ist es, eine einheitliche Klassifizierung für den Ethylenproduktionstyp zu finden anhand der produzierten Ethylenmenge entweder zu einem bestimmten Zeitpunkt oder in einem definierten Zeitraum. Weiterhin sollte für jede Sorte die Kategorie des Weichwerdens bestimmt werden, um die Ethylensensitivität der Sorten zu kennen. Diese Einteilungen sind wichtig, um zum einen eine geeignete Sortenauswahl treffen zu können und zum anderen um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu schaffen. Um den Auslöser der Ethylensensitivität zu suchen, sollte neben der Genexpression der Ethylenrezeptoren und der ERF-Transkriptionsfaktoren auch deren Hierbei könnte Proteingehalte gemessen werden. sich die Messung mittels Massenspektrometrie als eine alternative Methoden zur Antikörpermarkierung herausstellen. Mit der Quantifizierung einzelner Rezeptoren sowie aller Rezeptoren könnte ein Verhältnis zur Fruchtfleischfestigkeit geprüft und weiterhin in Bezug zur Kategorie des Weichwerdens und damit zur Ethylensensitivität gestellt werden. Mit der Quantifizierung der ERF-Proteine könnte das Maß der Ethylenantwort vermutlich besser eingeschätzt werden, als anhand der Genexpression, da die Menge an Transkripten der Gene nicht 1:1 zur Menge an translatiertem Protein stehen muss. Daneben sollten die Genexpression des ACS-Gens 6 und die Alle-Kombination von MdACS1 bei verschiedenen Sorten bestimmt werden, um einen Zusammenhang zur jeweiligen Kategorie des Weichwerdens zu prüfen.

Auf der anderen Seite ist die Aufklärung über die Veränderung der Zellwand, die maßgeblich die Fruchtfleischfestigkeit bedingt, weiter voran zu treiben. Dabei ist zwar der Einfluss von PG geklärt, allerdings nicht dessen genetischer Regulierung. Andere zellwandmodifizierende Enzyme wie GAL, AF und XYL sind zwar vereinzelt betrachtet worden, aber für eine abschließende Bewertung ihres Einflusses auf die sortenspezifische Fruchtfleischfestigkeitsabnahme reichen die Indizien nicht aus. Weiterhin zeigte die Genexpression von MdPL, MdEGase sowie MdXTH2 und MdXTH10 interessante Hinweise auf ein reiferelevantes oder sortenspezifisches Verhalten, deren Expressionsmuster in engeren zeitlichen Abständen als den hier gewählten bestimmt werden sollte. Um den Einfluss der genannten zellwandmodifizierenden Enzyme zu beurteilen, ist es unerlässlich neben deren Genexpression auch ihre Enzymaktivität oder Proteingehalte sowie die Gehalte ihres jeweiligen Substrates zu bestimmen. Letzteres auch in einzelnen Zellwandfraktionen, um einen Hinweis auf Verflechtung innerhalb der Zellwand zu erhalten. Zwar ist die Anordnung der Interzellularen nicht von sonderlicher Cortexzellen und Bedeutung für die Fruchtfleischfestigkeit, aber die Zusammensetzung der Zellwand ist es. Daher sollte die

Struktur der Zellwand weiterhin mikroskopisch betrachtet werden, um diese bildhaft abbilden zu können als ergänzende Information zu quantitativen Messungen. Hierbei empfehlen sich dann höher auflösende Verfahren als die Lichtmikroskopie, wie die Fluorenszenz- oder Atomkraftmikroskopie.

8. Zusammenfassung

Die Reife der Apfelfrucht wird durch Ethylen, einem Reifungshormon, initiiert und der Reifebeginn ist durch einen Anstieg der fruchteigenen Ethylenproduktion gekennzeichnet. Während der Reife nimmt u.a. die Fruchtfleischfestigkeit ab, die eines der wichtigsten Qualitätsparameter für den Konsumenten und den Handel ist. Die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit des Apfels nach der Ernte verläuft dreiphasig, wobei die erste Phase, bei der es noch nicht zu einem signifikantem Festigkeitsabbau kommt, die wichtigste ist. Die Länge der ersten Phase unterscheidet sich in den Apfelsorten, dabei haben schnell weichwerdende Sorten eine kurze und lange festbleibende Sorten eine lange erste Phase. Durch Zugabe von Ethylen wird diese Phase, je nach Ethylensensitivität der Sorte, verkürzt. Die Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit wird hauptsächlich durch die Veränderung der Zellwand im Reifeverlauf bedingt. Ziel ist es zum einen die sortenspezifische Fruchtfleischfestigkeitsabnahme zu ergründen, indem die Genexpression einiger zellwandmodifizierender Gene sowie die Aktivität des zellwandmodifizierenden Enzyms β -Galaktosidase (GAL) bestimmt wird, und zum anderen der Ursache für die Ethylensensitivität der Sorten nachzugehen, indem die Ethylenproduktion, Aktivität und Genexpression der Ethylenbiosynthese-Enzyme sowie die Genexpression der Ethylenrezeptoren und der Ethylensignalproteine gemessen werden. Um die sortenspezifischen Veränderung zu erfassen, werden drei Apfelsorten mit unterschiedlichem Verlauf der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme und Ethylenproduktion verwendet und im Kühllager bei 10° C bis zu einer Lagerdauer von 4 Monaten verwahrt. Die Sorte ,Pinova' gilt als festbleibend und die Sorten ,Elstar' und ,Golden Delicious' als weichwerdend. ,Pinova' und ,Elstar' weisen eine vergleichsweise niedrige Ethylenproduktion zu, Golden Delicious' auf. Zusätzlich wird der Reifeverlauf dieser Sorten beeinflusst, indem dieser durch die Anwendung von 1-Methylcyclopropen (1-MCP) gehemmt und durch die Zugabe von Ethylen beschleunigt wird. Als wesentliche Ergebnisse zeigen sich, dass trotz unterschiedlicher Menge an produziertem Ethylen nur die weichwerdenden Sorten eine Korrelation zwischen Fruchtfleischfestigkeit und Ethylenproduktion aufweisen, obwohl die Genexpression der Ethylenbiosyntheseenzyme von ,Elstar' und ,Pinova' keinen Sortenunterschied erkennen lassen. Weiterhin zeigt sich kein Sortenunterschied in der Genexpression der Ethylenrezeptoren sowie der Signalproteine, obwohl "Elstar" ethylensensitiv im Gegensatz zu ,Pinova' ist. Durch Vergleiche mit der Literatur wird vermutet, dass zum einen die Menge der Ethylenrezeptoren ERS1 und ERS2 mit der Fruchtfleischfestigkeit in Zusammenhang stehen und zum anderen der Ethylenrezeptor ETR2 der Sensor der Ethylensensitivität sein könnte. Die Ergebnisse zur Aufklärung der Veränderung der Zellwand verweisen zwar auf einen Sortenunterschied in der Genexpression von MdPG, MdAF, MdXTH2 und MdXYL mit höheren

Werten bei 'Elstar', aber weder die erwartete Hemmung durch 1-MCP noch Förderung durch Ethylen dieser Gene ist eingetreten. Die GAL-Aktivität zeigt zwar ein sortenspezifisches Muster, welches aber nicht mit der Fruchtfleischfestigkeit korreliert. Auch für die Enzymaktivität anderer zellwandmodifizierender Enzyme oder Gesamtzellwandgehalte gibt es in der Literatur keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zur Fruchtfleischfestigkeit. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Verknüpfung der einzelnen Zellwandbestandteile zum einen die Fruchtfleischfestigkeit bedingt und zum anderen die Substratverfügbarkeit für die jeweiligen zellwandmodifizierenden Proteine limitiert.

9. Summary

Ripening of apples is initialized by ethylene, a ripening hormone, and the start of ripening is marked by an increase of ethylene production. During ripening fruit firmness is one of the changing processes and it is one of the major quality parameters for consumer and trade. After harvest the decline of apple fruit firmness consist of three distinct phase, in which the first phase, where no significant firmness reduce is observed, is the main part. The length of the first phase is different between the cultivars, so rapid softening cultivars have a short and cultivars, which obtain firmness over long time, have a long first phase. Application of ethylene will shorten this phase depending on the ethylene sensivity of the cultivars. The decline of fruit firmness is affected by changes in the cell wall. The aim of this study is to investigate this cultivar specific firmness decline by measuring gene expression of cell wall modifying enzymes and the activity of the cell wall modifying enzyme β -galactosidase (GAL), and to find out the reason for the ethylene sensivity of the cultivars by recording ethylene production, gene expression and activity of ethylene biosynthesis enzymes also gene expression of the ethylene receptors and ethylene signal transduction proteins. To reach that goals three cultivars with different firmness and ethylene production are used and stored up to 4 month in a cool storage with 10 °C. The used cultivars are 'Pinova', which maintain firmness, 'Elstar' and 'Golden Delicious', which soften rapidly. 'Pinova' and 'Elstar' have a low ethylene production compared to 'Golden Delicious'. Additional the ripening process is influenced by an inhibiting action of 1-Methylcyclopropen (1-MCP) and a promoting effect of ethylene. The main results are that correlation between ethylene production and fruit firmness persist just in softening cultivars although there are no difference between 'Elstar' and 'Pinova' in gene expression of ethylene biosynthesis enzymes. Also there are no differences between them in gene expression of ethylene receptors and ethylene signal transduction proteins while 'Elstar' shows an ethylene sensivity in contrast to 'Pinova'. By comparison of the literature it is hypothesized that the amount of the ethylene receptors ERS1 and ERS2 is related to fruit firmness and the ethylene receptor ETR2 could be the sensor of ethylene sensivity. Furthermore the results about the changes/shifting of the cell wall refer to a difference between the cultivars in the gene expression of MdPG, MdAF, MdXTH2 und MdXYL with higher values for 'Elstar', but neither the expected inhibition of 1-MCP nor the promotion of ethylene in this genes happened. The activity of GAL shows indeed a cultivar specific pattern but it doesn't correlate to fruit firmness. Also for other cell wall modifying enzyme activity or cell wall content exist no reference for a relationship to fruit firmness. So it is hypothesized that the interlinkage of the single cell wall components causes the fruit firmness on the one hand and limits the substrate availability of the respective cell wall modifying enzyme on the other hand.

Quellen

Statistisches Bundestamt,

https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFisch erei/ObstGemueseGartenbau/Tabellen/FlaechenErntemengenMarktobstanbau.html;jsess ionid=F4484AF3E95E41478855E43BC4E6D1A2.cae2 (abgerufen am 31.07.2018).

Statistisches Bundesamt,

https://de.statista.com/statistik/daten/studie/166875/umfrage/erntemenge-vonbaumobst-nach-obstsorte/ (abgerufen am 31.07.2018).

Bundesamt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE);

https://datenzentrum.ble.de/pflanzenproduktion/obst-und-gemuese-grafik/ (abgerufen am 31.07.2018).

Kompetenzzentrum Obst Bodensee (KOB),

http://kob-bavendorf.de/arbeitsbereiche/Lagerung/ernteempfehlung-apfel-undbirnensorten/view?searchterm=streif%20index (abgerufen am 29.08.2017).

- Allan-Wojtas, P., Sanford, K., McRae, K., and Carbyn, S. (2003). An Integrated Microstructural and Sensory Approach to Describe Apple Texture. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128, 381–390. Available at: http://journal.ashspublications.org/content/128/3/381.short.
- Alonso, J., Howell, N., and Canet, W. (1997). Purification and characterisation of two pectinmethylesterase from persimmon (Diospyros kaki). *J. Sci. Food Agric.* 75, 352–358. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199711)75:3<352::AID-JSFA885>3.3.CO;2-7.
- Atkinson, R. G., Johnston, S. L., Yauk, Y.-K., Sharma, N. N., and Schröder, R. (2009). Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 149–157. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.06.014.
- Atkinson, R. G., Sutherland, P. W., Johnston, S. L., Gunaseelan, K., Hallett, I. C., Mitra, D., et al. (2012). Down-regulation of POLYGALACTURONASE 1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC Plant Biol.* 12, 129. doi:10.1186/1471-2229-12-129.
- Barry, C. S., and Giovannoni, J. J. (2007). Ethylene and fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26, 143–159. doi:10.1007/s00344-007-9002-y.
- Bidhendi, A. J., and Geitmann, A. (2016). Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *J. Exp. Bot.* 67, 449–461. doi:10.1093/jxb/erv535.
- Bonnin, E., Garnier, C., and Ralet, M. C. (2014). Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 519–532. doi:10.1007/s00253-013-5388-6.
- Bonnin, E., and Lahaye, M. (2013). Contribution of cell wall-modifying enzymes to the texture of fleshy fruits. The example of apple. *J. Serbian Chem. Soc.* 78, 417–427. doi:10.2298/JSC121123004B.
- Brackmann, A., and Streif, J. (1994). Ethylene, CO2 and aroma volatiles production by apple cultivars. in *Acta Horticulturae* (International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium), 51–58. doi:10.17660/ActaHortic.1994.368.4.
- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disaseembly in ripening fruit. *Funct Plant Biol* 33, 103–119.
- Brummell, D. A., and Harpster, M. H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311–340. doi:10.1023/A:1010656104304.
- Bufler, G. (1986). Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. *Plant Physiol.* 80, 539–543. doi:10.1104/pp.80.2.539.
- Bulens, I., Van de Poel, B., Hertog, M. L. A. T. M., De Proft, M. P., Geeraerd, A. H., and Nicolaï,
 B. M. (2011). Protocol: An updated integrated methodology for analysis of metabolites and enzyme activities of ethylene biosynthesis. *Plant Methods* 7, 17. doi:10.1186/1746-4811-7-17.

- Caffall, K. H., and Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344, 1879–1900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021.
- Cleemput, G., Hessing, M., Van Oort, M., Deconynck, M., and Delcour, J. A. (1997). Purification and Characterization of a [beta]-D-Xylosidase and an Endo-Xylanase from Wheat Flour. *Plant Physiol.* 113, 377–386. doi:10.1104/pp.113.2.377.
- Cosgrove, D. J. (2015). Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 162–172. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.014.
- Cosgrove, D. J. (2016). Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000Research* 5, 1–13. doi:10.12688/f1000research.7180.1.
- Costa, F., Stella, S., Van De Weg, W. E., Guerra, W., Cecchinel, M., Dallavia, J., et al. (2005). Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (Malus domestica Borkh). *Euphytica* 141, 181–190. doi:10.1007/s10681-005-6805-4.
- Cybulska, J., Zdunek, A., Psonka-Antonczyk, K. M., and Stokke, B. T. (2013). The relation of apple texture with cell wall nanostructure studied using an atomic force microscope. *Carbohydr. Polym.* 92, 128–137. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.103.
- Dal Cin, V., Danesin, M., Boschetti, A., Dorigoni, A., and Ramina, A. (2005). Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borck). *J. Exp. Bot.* 56, 2995–3005. doi:10.1093/jxb/eri296.
- Dal Cin, V., Rizzini, F. M., Botton, A., and Tonutti, P. (2006). The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 42, 125–133. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.06.008.
- Dong, G. C., and Song, J. Y. (2004). Reduced cell size and cell wall components of apple softening before ripening on the tree. *HortScience* 39, 1227–1230.
- Dong, Q. L., Yan, Z. Y., Liu, Z., and Yao, Y. X. (2011). Early ripening events caused by bud mutation in Beni Shogun apple. *Russ. J. Plant Physiol.* 58, 439–447. doi:10.1134/S1021443711030034.
- Dougherty, L., Zhu, Y., and Xu, K. (2016). Assessing the allelotypic effect of two aminocyclopropane carboxylic acid synthase-encoding genes MdACS1 and MdACS3a on fruit ethylene production and softening in Malus. *Hortic. Res.* 3, 16024. doi:10.1038/hortres.2016.24.
- Drakakaki, G. (2015). Polysaccharide deposition during cytokinesis: Challenges and future perspectives. *Plant Sci.* 236, 177–184. doi:10.1016/j.plantsci.2015.03.018.
- Eklöf, J. M., and Brumer, H. (2010). The XTH Gene Family: An Update on Enzyme Structure, Function, and Phylogeny in Xyloglucan Remodeling. *Plant Physiol.* 153, 456–466. doi:10.1104/pp.110.156844.
- Fry, S. C. (1994). Plant Cell Expansion: Unzipped by expansins. *Curr. Biol.* 4, 815–817. doi:10.1016/S0960-9822(00)00180-9.
- Gapper, N. E., McQuinn, R. P., and Giovannoni, J. J. (2013). Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 82, 575–591. doi:10.1007/s11103-013-0050-3.
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 725–749.
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *Plant Cell* 16, 170–180. doi:10.1105/tpc.019158.Fruit.
- Goulao, L. F., Cosgrove, D. J., and Oliveira, C. M. (2008). Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 37–51. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.09.022.
- Goulao, L. F., Santos, J., de Sousa, I., and Oliveira, C. M. (2007). Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 307–318. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.10.002.
- Gwanpua, S. G., Mellidou, I., Boeckx, J., Kyomugasho, C., Bessemans, N., Verlinden, B. E., et al. (2016a). Expression analysis of candidate cell wall-related genes associated with changes in pectin biochemistry during postharvest apple softening. *Postharvest Biol. Technol.* 112,

176–185. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.09.034.

- Gwanpua, S. G., Van Buggenhout, S., Verlinden, B. E., Christiaens, S., Shpigelman, A., Vicent, V., et al. (2014). Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chem.* 158, 283–291. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.138.
- Gwanpua, S. G., Verlinden, B. E., Hertog, M. L. A. T. M., Nicolai, B. M., Hendrickx, M., and Geeraerd, A. (2016b). Slow softening of Kanzi apples (*Malus × Domestica* L.) is associated with preservation of pectin integrity in middle lamella. *Food Chem.* 211, 883–891. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.138.
- Hagerman, A. E., and Austin, P. J. (1986). Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. J. Agric. Food Chem. 34, 440–444. doi:10.1021/jf00069a015.
- Hall, A. E., and Bleecker, A. B. (2003). Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the Arabidopsis ethylene receptors reveals that the ers1 etr1 double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell* 15, 2032–2041. doi:10.1105/tpc.013060.
- Harb, J., Alseekh, S., Tohge, T., and Fernie, A. R. (2015). Profiling of primary metabolites and flavonols in leaves of two table grape varieties collected from semiarid and temperate regions. *Phytochemistry* 117, 444–455. doi:10.1016/j.phytochem.2015.07.013.
- Harb, J., Gapper, N. E., Giovannoni, J. J., and Watkins, C. B. (2012). Molecular analysis of softening and ethylene synthesis and signaling pathways in a non-softening apple cultivar, "Honeycrisp" and a rapidly softening cultivar, "McIntosh." *Postharvest Biol. Technol.* 64, 94–103. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.10.001.
- Harker, F. R., Redgwell, R. J., Hallett, I. C., Murray, S. H., and Carter, G. (1997). "Texture of fresh fruit," in *Horticultural Reviews*, ed. Jules Janick (Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc.), 121–224. doi:10.1002/9780470650646.ch2.
- Hocking, B., Tyerman, S. D., Burton, R. A., and Gilliham, M. (2016). Fruit Calcium : Transport and Physiology. *Front. Plant Sci.* 7, 1–17. doi:10.3389/fpls.2016.00569.
- Hyodo, H., Terao, A., Furukawa, J., Sakamoto, N., Yurimoto, H., Satoh, S., et al. (2013). Tissue specific localization of pectin-Ca²⁺ cross-linkages and pectin methyl-esterification during fruit ripening in tomato (Solanum lycopersicum). *PLoS One* 8, e78949. doi:10.1371/journal.pone.0078949.
- Ireland, H. S., Guillen, F., Bowen, J., Tacken, E. J., Putterill, J., Schaffer, R. J., et al. (2012). Mining the apple genome reveals a family of nine ethylene receptor genes. *Postharvest Biol. Technol.* 72, 42–46. doi:10.1016/j.postharvbio.2012.05.003.
- Ireland, H. S., Gunaseelan, K., Muddumage, R., Tacken, E. J., Putterill, J., Johnston, J. W., et al. (2014). Ethylene Regulates Apple (Malus x domestica) Fruit Softening Through a Dose x Time-Dependent Mechanism and Through Differential Sensitivities and Dependencies of Cell Wall-Modifying Genes. *Plant Cell Physiol*. 55, 1005–1016. doi:10.1093/pcp/pcu034.
- Itai, A., Ishihara, K., and Bewley, J. D. (2003). Characterization of expression, and cloning, of β-D-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. J. Exp. Bot. 54, 2615–2622. doi:10.1093/jxb/erg291.
- Johnston, J. W., Gunaseelan, K., Pidakala, P., Wang, M., and Schaffer, R. J. (2009). Coordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *J. Exp. Bot.* 60, 2689–2699. doi:10.1093/jxb/erp122.
- Johnston, J. W., Hewett, E. W., Banks, N. H., Harker, F. R., and Hertog, M. L. A. T. M. (2001a). Physical change in apple texture with fruit temperature: Effects of cultivar and time in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 23, 13–21. doi:10.1016/S0925-5214(01)00101-6.
- Johnston, J. W., Hewett, E. W., and Hertog, M. L. A. T. M. (2002a). Postharvest softening of apple (Malus domestica) fruit: A review. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 30, 145–160. doi:10.1080/01140671.2002.9514210.
- Johnston, J. W., Hewett, E. W., Hertog, M. L. A. T. M., and Harker, F. R. (2002b). Temperature and ethylene affect induction of rapid softening in "Granny Smith" and "Pacific Rose[™]" apple cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 25, 257–264. doi:10.1016/S0925-

5214(01)00194-6.

- Johnston, J. W., Hewett, E. W., Hertog, M. L. a T. M., and Roger Harker, F. (2001b). Temperature induces differential softening responses in apple cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 23, 185–196. doi:10.1016/S0925-5214(01)00127-2.
- Ju, C., and Chang, C. (2015). Mechanistic Insights in Ethylene Perception and Signal Transduction. *Plant Physiol.* 169, 85–95. doi:10.1104/pp.15.00845.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., and Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 8, 1–16. doi:10.1186/1471-2105-8-131.
- Kendrick, M. D., and Chang, C. (2008). Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 479–485. doi:10.1016/j.pbi.2008.06.011.
- Kevany, B. M., Tieman, D. M., Taylor, M. G., Dal Cin, V., and Klee, H. J. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant J.* 51, 458–467. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03170.x.
- Kittemann, D. G. (2012). Untersuchungen zu Fruchtfleischfestigkeit und Zellwandabbau von Apfelfrüchten während der Lagerung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Ethylen.
- Klee, H. J. (2004). Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135, 660–667. doi:10.1104/pp.104.040998.
- Krall, S. M., and McFeeters, R. F. (1998). Pectin Hydrolysis: Effect of Temperature, Degree of Methylation, pH, and Calcium on Hydrolysis Rates. J. Agric. Food Chem. 46, 1311–1315. doi:10.1021/jf970473y.
- Lacey, R. F., and Binder, B. M. (2014). How plants sense ethylene gas The ethylene receptors. *J. Inorg. Biochem.* 133, 58–62. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006.
- Lara, I., and Vendrell, M. (2003). Cold-induced ethylene biosynthesis is differentially regulated in peel and pulp tissues of "Granny Smith" apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 29, 109–119. doi:10.1016/S0925-5214(02)00243-0.
- Levesque-Tremblay, G., Pelloux, J., Braybrook, S. A., and Müller, K. (2015). Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta*, 791–811. doi:10.1007/s00425-015-2358-5.
- Levy, I., Shani, Z., and Shoseyov, O. (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol. Eng.* 19, 17–30. doi:10.1016/S1389-0344(02)00007-2.
- Li, J., and Yuan, R. (2008). NAA and ethylene regulate expression of genes related to ethylene biosynthesis, perception, and cell wall degradation during fruit abscission and ripening in "Delicious" apples. J. Plant Growth Regul. 27, 283–295. doi:10.1007/s00344-008-9055-6.
- Li, J., Zhu, H., and Yuan, R. (2010). Profiling the Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Ethylene Perception, and Cell Wall Degradation during Fruit Abscission and Fruit Ripening in Apple. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 135, 391–401.
- Li, T., Jiang, Z., Zhang, L., Tan, D., Wei, Y., Yuan, H., et al. (2016). Apple (*Malus domestica*) MdERF2 negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription. *Plant J.* 88, 735–748. doi:10.1111/tpj.13289.
- Li, T., Tan, D., Liu, Z., Jiang, Z., Wei, Y., Zhang, L., et al. (2015). Apple MdACS6 regulates ethylene biosynthesis during fruit development involving ethylene-responsive factor. *Plant Cell Physiol.* 56, 1909–1917. doi:10.1093/pcp/pcv111.
- Li, T., Tan, D., Yang, X., and Wang, A. (2013). Exploring the apple genome reveals six ACC synthase genes expressed during fruit ripening. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 157, 119–123. doi:10.1016/j.scienta.2013.04.016.
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.-P., and Bouzayen, M. (2015). Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiol*. 169, 2380–2390. doi:10.1104/pp.15.01361.
- Lohani, S., Trivedi, P. K., and Nath, P. (2004). Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: Effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 119–126. doi:10.1016/j.postharvbio.2003.08.001.

- Lu, X., Nock, J. F., Ma, Y., Liu, X., and Watkins, C. B. (2013). Effects of repeated 1methylcyclopropene (1-MCP) treatments on ripening and superficial scald of "Cortland" and "Delicious" apples. *Postharvest Biol. Technol.* 78, 48–54. doi:10.1016/j.postharvbio.2012.12.007.
- Mann, H. S., Alton, J. J., Kim, S., and Tong, C. B. S. (2008). Differential Expression of Cell-wall Modifying Genes and Novel cDNAs in Apple Fruit During Storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133, 152–157. Available at: http://journal.ashspublications.org/content/133/1/152.full.
- Marowa, P., Ding, A., and Kong, Y. (2016). Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep.* 35, 949–965. doi:10.1007/s00299-016-1948-4.
- McAtee, P. a, Hallett, I. C., Johnston, J. W., and Schaffer, R. J. (2009). A rapid method of fruit cell isolation for cell size and shape measurements. *Plant Methods* 5, 5. doi:10.1186/1746-4811-5-5.
- Ng, J. K. T., Schröder, R., Brummell, D. A., Sutherland, P. W., Hallett, I. C., Smith, B. G., et al. (2015). Lower cell wall pectin solubilisation and galactose loss during early fruit development in apple (*Malus x domestica*) cultivar 'Scifresh' are associated with slower softening rate. *J. Plant Physiol.* 176, 129–137. doi:10.1016/j.jplph.2014.12.012.
- Ng, J. K. T., Schröder, R., Sutherland, P. W., Hallett, I. C., Hall, M. I. ., Prakash, R., et al. (2013). Cell wall structures leading to cultivar differences in softening rates develop early during apple (Malus x domestica) fruit growth. *BMC Plant Biol.* 13, 183. doi:10.1186/1471-2229-13-183.
- Nobile, P. M., Wattebled, F., Quecini, V., Girardi, C. L., Lormeau, M., and Laurens, F. (2011). Identification of a novel α-L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. J. Exp. Bot. 62, 4309–21. doi:10.1093/jxb/err146.
- Oraguzie, N. C., Iwanami, H., Soejima, J., Harada, T., and Hall, A. (2004). Inheritance of the Md-ACS1 gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theor. Appl. Genet.* 108, 1526–1533. doi:10.1007/s00122-003-1574-8.
- Oraguzie, N. C., Volz, R. K., Whitworth, C. J., Bassett, H. C. M., Hall, A. J., and Gardiner, S. E. (2007). Influence of Md-ACS1 allelotype and harvest season within an apple germplasm collection on fruit softening during cold air storage. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 212–219. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.12.013.
- Ortiz, A., Graell, J., and Lara, I. (2011a). Cell wall-modifying enzymes and firmness loss in ripening "Golden Reinders" apples: A comparison between calcium dips and ULO storage. *Food Chem.* 128, 1072–1079. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.016.
- Ortiz, A., Graell, J., and Lara, I. (2011b). Preharvest calcium applications inhibit some cell wallmodifying enzyme activities and delay cell wall disassembly at commercial harvest of "Fuji Kiku-8" apples. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 161–167. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.04.014.
- Paniagua, C., Pose, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., and Mercado, J. A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann. Bot.* 114, 1375–1383. doi:10.1093/aob/mcu149.
- Park, Y. B., and Cosgrove, D. J. (2015). Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol.* 56, 180–194. doi:10.1093/pcp/pcu204.
- Payasi, A., Mishra, N. N., Soares Chaves, A. L., and Singh, R. (2009). Biochemistry of fruit softening: An overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15, 103–113. doi:10.1007/s12298-009-0012-z.
- Payasi, A., and Sanwal, G. G. (2010). Ripening of climacteric fruits and their control. J. Food Biochem. 34, 679–710. doi:10.1111/j.1745-4514.2009.00307.x.
- Rose, J. K. C., Braam, J., Fry, S. C., and Nishitani, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglycosylation and endohyrdolosis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43, 1421–1435. doi:10.1093/pcp/pcf171.
- Ruiz-May, E., and Rose, J. K. C. (2013). "Cell Wall Architecture and Metabolism in Ripening Fruit
and the Complex Relationship with Softening," in *The Molecular Biology and Biochemistry* of Fruit Ripening, ed. J. J. G. and G. A. T. G. B. Seymour, M. Poole (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), 163–187. doi:10.1002/9781118593714.ch7.

- Saftner, R. A. (1999). The potential of fruit coating and film treatments for improving the storage and shelf-life qualities of "Gala" and "Golden Delicious" apples. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 124, 682–689.
- Sato, T., Kudo, T., Akada, T., Wakasa, Y., Niizeki, M., and Harada, T. (2004). Allelotype of a Ripening-specific 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase Gene Defines the Rate of Fruit Drop in Apple. *Gene* 129, 32–36.
- Senechal, F., Wattier, C., Rusterucci, C., and Pelloux, J. (2014). Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *J. Exp. Bot.* 65, 5125–5160. doi:10.1093/jxb/eru272.
- Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M., and Schaller, G. E. (2013). Mechanisms of signal transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants* 5, 1–16. doi:10.1093/aobpla/plt010.
- Smertenko, A., Assaad, F., Baluška, F., Bezanilla, M., Buschmann, H., Drakakaki, G., et al. (2017). Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends Cell Biol.* 27, 885-. doi:10.1016/j.tcb.2017.08.008.
- Storch, T. T., Finatto, T., Pegoraro, C., Dal Cero, J., Laurens, F., Rombaldi, C. V., et al. (2015). Ethylene-dependent regulation of an α-L-arabinofuranosidase is associated to firmness loss in 'Gala' apples under long term cold storage. *Food Chem.* 182, 111–119. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.123.
- Streif, J. (1996). Optimum harvest date for different apple cultivars in the "Bodensee" area. COST 94. postharvest Treat. fruit Veg. Determ. Predict. Optim. Harvest date apples pears. Proc. a Meet. Lofthus, Norway, 9-10 June 1994., 15–20. Available at: http://www.redibw.de/db/ebsco.php/search.ebscohost.com/login.aspx%253fdirect%253dtrue%2526db% 253dlah%2526AN%253d19960308191%2526site%253dehost-live.
- Streif, J. (2002). "Ernte, Lagerung und Verpackung," in *Lucas' Anleitung zum Obstbau*, ed. H. Link (Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co.), 338–369.
- Sunako, T., Sakuraba, W., Senda, M., Akada, S., Ishikawa, R., Niizeki, M., et al. (1999). An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119, 1297–1304. doi:10.1104/pp.119.4.1297.
- Tacken, E., Ireland, H., Gunaseelan, K., Karunairetnam, S., Wang, D., Schultz, K., et al. (2010). The role of ethylene and cold temperature in the regulation of the apple POLYGALACTURONASE1 gene and fruit softening. *Plant Physiol.* 153, 294–305. doi:10.1104/pp.109.151092.
- Tan, D., Li, T., and Wang, A. (2013). Apple 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Genes, MdACS1 and MdACS3a, are Expressed in Different Systems of Ethylene Biosynthesis. *Plant Mol. Biol. Report.* 31, 204–209. doi:10.1007/s11105-012-0490-y.
- Tateishi, A. (2008). β-Galactosidase and α-L-Arabinofuranosidase in Cell Wall Modification Related with Fruit Development and Softening. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 77, 329–340. doi:10.2503/jjshs1.77.329.
- Tatsuki, M., Endo, A., and Ohkawa, H. (2007). Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 28–35. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.08.010.
- Tatsuki, M., Hayama, H., and Nakamura, Y. (2009). Apple ethylene receptor protein concentrations are affected by ethylene, and differ in cultivars that have different storage life. *Planta* 230, 407–417. doi:10.1007/s00425-009-0953-z.
- Tatsuki, M., Hayama, H., Yoshioka, H., and Nakamura, Y. (2011). Cold pre-treatment is effective for 1-MCP efficacy in "Tsugaru" apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 282–287. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.07.005.

- Tian, M. S., Prakash, S., Zhang, N., and Ross, G. S. (2002). Chilling-induced ethylene biosynthesis in Braeburn apples. *Plant Growth Regul.* 38, 249–257. doi:10.1023/A:1021552002676.
- Tieman, D. M., Taylor, M. G., Ciardi, J. A., and Klee, H. J. (2000). The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5663–5668. doi:10.1073/pnas.090550597.
- Toivonen, P. M. A., and Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 1–14. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.09.004.
- Tong, C., Krueger, D., Vickers, Z., Bedford, D., Luby, J., El-Shiekh, A., et al. (1999). Comparison of softening-related changes during storage of "Honeycrisp" apple, its parents, and "Delicious." J. Am. Soc. Hortic. Sci. 124, 407–415.
- Trujillo, D. I., Mann, H. S., and Tong, C. B. S. (2012). Examination of expansin genes as related to apple fruit crispness. *Tree Genet. Genomes* 8, 27–38. doi:10.1007/s11295-011-0417-z.
- Vanderstraeten, L., and Van Der Straeten, D. (2017). Accumulation and Transport of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) in Plants : Current Status, Considerations for Future Research and Agronomic Applications. *Front. Plant Sci.* 8, 1–18. doi:10.3389/fpls.2017.00038.
- Varanasi, V., Shin, S., Johnson, F., Mattheis, J. P., and Zhu, Y. (2013). Differential Suppression of Ethylene Biosynthesis and Receptor Genes in "Golden Delicious" Apple by Preharvest and Postharvest 1-MCP Treatments. J. Plant Growth Regul. 32, 585–595. doi:10.1007/s00344-013-9326-8.
- Varanasi, V., Shin, S., Mattheis, J., Rudell, D., and Zhu, Y. (2011). Expression profiles of the MdACS3 gene suggest a function as an accelerator of apple (*Malus×domestica*) fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 62, 141–148. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.05.005.
- Vicente, A. R., Costa, M. L., Martínez, G. A., Chaves, A. R., and Civello, P. M. (2005). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 38, 213–222. doi:10.1016/j.postharvbio.2005.06.005.
- Vilaplana, R., Soria, Y., Valentines, M. C., and Larrigaudière, C. (2007). Specific response of apple skin and pulp tissues to cold stress and 1-MCP treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 215–220. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.09.003.
- Wakasa, Y., Kudo, H., Ishikawa, R., Akada, S., Senda, M., Niizeki, M., et al. (2006). Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 193–198. doi:10.1016/j.postharvbio.2005.10.005.
- Wang, A., Tan, D., Takahashi, A., Li, T. Z., and Harada, T. (2007). MdERFs, two ethyleneresponse factors involved in apple fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 58, 3743–3748. doi:10.1093/jxb/erm224.
- Wang, A., Tan, D., Tatsuki, M., Kasai, A., Li, T., Saito, H., et al. (2009a). Molecular mechanism of distinct ripening profiles in "Fuji" apple fruit and its early maturing sports. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 38–43. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.09.001.
- Wang, A., and Xu, K. (2012). Characterization of Two Orthologs of REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1 in Apple. J. Mol. Biol. Res. 2, 24–41. doi:10.5539/jmbr.v2n1p24.
- Wang, A., Yamakake, J., Kudo, H., Wakasa, Y., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., et al. (2009b). Null mutation of the MdACS3 gene, coding for a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1carboxylate synthase, leads to long shelf life in apple fruit. *Plant Physiol.* 151, 391–399. doi:10.1104/pp.109.135822.
- Wang, D., Yeats, T. H., Uluisik, S., Rose, J. K. C. C., and Seymour, G. B. (2018). Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. *Trends Plant Sci.* 23, 302–310. doi:10.1016/j.tplants.2018.01.006.
- Watkins, C. B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* 24, 389–409. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.01.005.
- Watkins, C. B., Bowen, J. H., and Walker, V. J. (1989). Assessment of ethylene production by

apple cultivars in relation to commercial harvest dates. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 17, 327–331. doi:10.1080/01140671.1989.10428052.

- Wei, J., Ma, F., Shi, S., Qi, X., Zhu, X., and Yuan, J. (2010). Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 147–154. doi:10.1016/j.postharvbio.2009.12.003.
- Wiersma, P. A., Zhang, H., Lu, C., Quail, A., and Toivonen, P. M. A. (2007). Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of "Sunrise" and "Golden Delicious" apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 204–211. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.12.016.
- Yang, H., Liu, J., Dang, M., Zhang, B., Li, H., and Meng, R. (2018). Analysis of β-Galactosidase During Fruit Development and Ripening in Two Different Texture Types of Apple Cultivars. Front. Plant Sci. 9, 1–13. doi:10.3389/fpls.2018.00539.
- Yang, L., Huang, W., Xiong, F., Xian, Z., Su, D., Ren, M., et al. (2017). Silencing of SIPL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnol. J.* 15, 1544–1555. doi:10.1111/pbi.12737.
- Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., and Zhang, Z. (2013). Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 78, 55–66. doi:10.1016/j.postharvbio.2012.11.012.
- Zemlyanskaya, E. V., Omelyanchuk, N. A., Ermakov, A. A., and Mironova, V. V. (2017). Mechanisms Regulating Ethylene Signal Transduction in Plants. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 7, 335–344. doi:10.1134/S2079059717030169.
- Zhang, S., Xu, R., Gao, Z., Chen, C., Jiang, Z., and Shu, H. (2014). A genome-wide analysis of the expansin genes in *Malus × Domestica*. *Mol. Genet. Genomics* 289, 225–236. doi:10.1007/s00438-013-0796-y.
- Zhu, Y., and Barritt, B. H. (2008). Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genet. Genomes* 4, 555–562. doi:10.1007/s11295-007-0131-z.

Anhang



Abbildung A. 1: Zeitlicher Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit [N] der Sorten "Elstar" (A) und "Pinova" (B) über eine 3-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Der statistische Vergleich (p < 0,05) der Probennahmezeitpunkte im zeitlichen Verlauf einer Behandlung führte zur Einteilung der drei Phase (nichtsignifikante Veränderung (I), signifikante Abnahme (II), nichtsignifikante Veränderung (111)) der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme. Der sigmoidale Verlauf der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme der K-Variante wurde mit der Boltzmann-Funktion (schwarze durchgehende Linie) beschrieben (r^2 = adjustierte Korrelationskoeffizient; x₀ = Wendepunkt der Funktion). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert mit Standardabweichung, wobei nichtsignifikante Behandlungsvarianten zusammengefasst wurden. K = unbehandelte Kontrolle (n = 24); M_{0.0+E9} = 1-MCP-Behandlung am Tag 0 der Lagerdauer und 1-MCP-Behandlung am Tag 0 der Lagerdauer mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tage Lagerdauer (n = 48); M_{7,7+E9} = 1-MCP-Behandlung am Tag 7 der Lagerdauer und 1-MCP-Behandlung am Tag 7 der Lagerdauer mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tage Lagerdauer (n = 48); $M_{0,7+E9}$ = 1-MCP-Behandlung am Tag 0 sowie am Tag 7 der Lagerdauer und 1-MCP-Behandlung am Tag 0 sowie 7 der Lagerdauer mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tage Lagerdauer (n = 96); E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (n = 24).



Abbildung A. 2: Zeitlicher Verlauf der Fruchtfleischfestigkeit [N] der Sorten ,Elstar' (A), ,Pinova' (B) und ,Golden Delicious' (C) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils das Ende des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 1 der Lagerdauer und Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer sowie ab dem 7. Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen von jeweils 48 h am dritten Tag der Lagerdauer in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen in Intervallen. Jeder Datenpunkt

repräsentiert den Mittelwert (n = 21) mit Standardabweichung. Der statistische Vergleich (p < 0,05) einzelner der Probennahmezeitpunkte im zeitlichen Verlauf einer Behandlung führte zur Einteilung der drei Phase (Plateau (I), signifikante Abnahme (II), Plateau (III)) der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme. Der sigmoidale Verlauf der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme der K-Variante wurde mit der Boltzmann-Funktion (schwarze durchgehende Linie) beschrieben (r^2 = adjustierte Korrelationskoeffizient; x₀ = Wendepunkt der Funktion).



Abbildung A. 3: Zeitlicher Verlauf der Ethylenproduktion [µ|*kg⁻¹*h⁻¹] (A, B) und der ACO-Aktivität [nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹] (C, D) der Sorten ,Elstar' (A, C, E) und ,Pinova' (B, D, F) über eine 3-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2012/13. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils das Ende des sortentypischen Erntefensters. Die Früchte erhielten vor der Analyse eine Akklimatisierung an RT und die Probennahme für die Messung der Ethylenproduktion fand bei 20 °C nach 2 h statt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Originaldaten (n = 3) mit Standardabweichung. K = unbehandelte Kontrolle; M0 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer; M7 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer; E9 = Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer; M0+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer; M7+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer; M7+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer; M7+E9 = Behandlung mit 1-MCP am Tag 7 der Lagerdauer und permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer. Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf den Beginn einer signifikant (p < 0,05) erhöhten Enzymaktivität bzw. Ethylenproduktion in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzel-transformierten Daten.



Abbildung A. 4: Zeitlicher Verlauf der Ethylenproduktion [µ|*kg⁻¹*h⁻¹] (A, B, C) und ACO-Aktivität [nl C₂H₄*g⁻¹*h⁻¹] (D, E, F) der Sorten ,Elstar' (A, D, G), ,Pinova' (B, E, H) und ,Golden Delicious' (C, F, I) über eine 4-monatige Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre im Jahr 2013/14. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils das Ende des sortentypischen Erntefensters. K = unbehandelte Kontrolle; M1+E3 = Behandlung mit 1-MCP einen Tag nach der Ernte und Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte sowie ab 7 Tage nach der Ernte in 7-tägigen Abständen; E3 = Behandlung mit Ethylen periodisch für 48 h am dritten Tag nach der Ernte in 7-tägigen Abständen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert (n = 3) mit Standardabweichung. Die sternförmigen Datenpunkte verweisen auf den Beginn einer signifikant (p < 0,05) erhöhten Enzymaktivität bzw. Ethylenproduktion in der jeweiligen Behandlung im Vergleich zum Ausgangswert des Lagerbeginns, dabei beruhen die Berechnungen auf Wurzeltransformierten Daten. Fehlende Datenpunkte innerhalb der Zeitreihe beruhen auf einem defekten Gaschromatographen zu diesen Zeitpunkten.



Abbildung A. 5: Horizontalschnitt aus der Äquatorialebene von Apfelfrüchten der Sorte ,Elstar' (A, C, E) und ,Pinova' (B, D, F) aus dem Versuchsjahr 2012/13 nach einer Lagerdauer von 3 Monaten bei 10 °C und normaler Atmosphäre. Der Erntetermin dieser Sorten war jeweils der Anfang des sortentypischen Erntefensters. Die Behandlungsvarianten waren eine unbehandelte Kontrolle (K) (A, B), eine Behandlung mit 1-MCP am Tag 0 der Lagerdauer (M0) (C, D) und eine Behandlung mit permanenter Ethylenzufuhr ab 9 Tagen Lagerdauer (E9) (E, F). Interzellulare (i), Cortexzelle (c). Färbung: PAS. 5-fach Vergrößerung.



- Abbildung A. 6: Zeitlicher Verlauf der Ethylenkonzentration [C₂H₄ μl*l⁻¹] innerhalb der Versuchsbehälter mit den Apfelfrüchten der unbehandelten Kontrolle der Sorten 'Elstar', 'Pinova' und 'Golden Delicious' während einer 4-monatigen Lagerdauer bei 10 °C und normaler Atmosphäre.
- Tabelle A. 1: Übersicht einiger Apfelsorten, deren Festigkeitstyp, Höhe der Ethylenproduktion und Kategorie des Weichwerdens anhand eines Literaturvergleichs (Quelle) einzuteilen ist. Dabei wird der Festigkeitstyp in die zwei Klassen weichwerdend (weich) und festbleibend (fest) anhand der Länge der I. Phase (nichtsignifikante Veränderung) der Fruchtfleischfestigkeitsabnahme, die Höhe der Ethylenproduktion in die zwei Klassen niedrig und hoch anhand des maximalen Wertes der Ethylenproduktion und der Kategorie des Weichwerdens anhand der Länge der I. Phase und deren Verkürzung durch einen Ethylenreiz in die drei Kategorien 1 (kurze I. Phase unabhängig der Reizung), 2 (lange I. Phase, die durch die Reizung verkürzt wird) und 3 (lange I. Phase unabhängig der Reizung) klassifiziert.

Sorte	Festigkeits-	Ethylen-	Kategorie des	Quelle
	typ	produzent	Weichwerdens	Quelle
,Akiyoʻ	fest	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Aori 4'	weich	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Cortland'	weich	hoch		Lu <i>et al.,</i> 2013
,Cox´s Orangeʻ	weich	hoch	1	Brackman & Streif, 1994; Johnston <i>et al.</i> , 2001a,b; Watkins <i>et al.</i> , 1989
,Elstar'	weich	niedrig	2	Brackman & Streif, 1994; Kittemann, 2012
,Fuji'	fest	niedrig	3	Brackman & Streif, 1994; Wakasa <i>et al.</i> , 2006; Oraguzie <i>et</i> <i>al.</i> , 2007; Tatsuki <i>et al.</i> , 2007; Wei <i>et al.</i> , 2010
,Golden Delicious'	weich	hoch	1	Brackman & Streif, 1994; Saftner, 1999; Wakasa <i>et al.,</i> 2006; Wei <i>et al.,</i> 2010; Tan <i>et</i> <i>al.</i> , 2013; Gwanpua <i>et al.,</i> 2016
,Granny Smithʻ	fest	niedrig	2	Watkins <i>et al.,</i> 1989; Brackmann & Streif, 1994; Johnston <i>et al.,</i> 2002b; Gwanpua <i>et al.,</i> 2016a

,Gunma Meigetsuʻ	fest	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Himekamiʻ	weich	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Honey Crispʻ	fest	niedrig		Tong <i>et al.</i> , 1999; Harb <i>et al.,</i> 2012
,Hozuri'	weich	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Iwakami'	weich	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Jonagold'	weich	hoch		Brackmann & Streif, 1994; Gwanpua <i>et al.</i> , 2014
,Kanziʻ	fest	niedrig		Gwanpua <i>et al.,</i> 2016b
,Kitarouʻ	fest	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Kotaroʻ	weich	hoch		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,McIntosh'	weich	hoch		Brackman & Streif, 1994; Harb <i>et al.</i> , 2012
,Orin'	weich	hoch		Tatsuki <i>et al.,</i> 2007
,Pacific Rose'	fest	niedrig	3	Johnston <i>et al.,</i> 2002b; Oraguzie <i>et al.,</i> 2007
,Pinova'	fest	niedrig	3	Kittemann, 2012
,Red Fuji'	fest	niedrig		Tan <i>et al.</i> , 2013
,Royal Galaʻ	weich	gering	1	Johnston <i>et al.,</i> 2001a,b; Oraguzie <i>et al.</i> , 2007; Ng <i>et al.,</i> 2013
,Scifresh'	fest	niedrig		Ng et al., 2013
,Slimred'	fest	niedrig		Wakasa <i>et al.,</i> 2006
,Sunrise'	weich	hoch		Wiersma <i>et al.,</i> 2007
,Tsugaru'	weich	hoch		Tatsuki <i>et al.,</i> 2011
,Virginia Goldʻ	fest	hoch		Dougherty <i>et al.</i> , 2016

Variable	PC1	PC2
ACO1	0,469	-0,007
ACS1	0,487	-0,039
ACS3	-0,197	-0,659
FFF	0,334	-0,559
Ethyl.prod.	0,401	-0,437
ACO.Akt.	0,482	-0,246
Eigenwert	1,901	1,190
Verteilung der Varianz	0,602	0,236
kumulative Verteilung	0,602	0,838

Tabelle A. 2: Gewichte der Variablen für die Hauptkomponentenanalyse 1 mit den Eigenwerten >1 und der Anteil der Verteilung, der durch die jeweilige Hauptkomponente (PC) erklärt wird.

 Tabelle A. 3: Gewichte der Variablen für die Hauptkomponentenanalyse 2 mit den Eigenwerten >1 und dem Anteil der Verteilung, der durch die jeweilige Hauptkomponente (PC) erklärt wird.

Variable	PC1	PC2	PC3
CTR1	0,301	0,118	0,588
ERF1	0,405	-0,349	0,155
ERS1	0,417	-0,261	-0,085
ERS2	0,279	0,395	-0,552
ETR1	0,300	0,383	0,469
ETR2	0,408	0,175	-0,198
FFF	-0,403	-0,107	0,224
Ethyl.prod.	0,164	-0,672	-0,090
Eigenwert	1,920	1,265	1,007
Verteilung der Varianz	0,461	0,200	0,127
kumulative Verteilung	0,461	0,661	0,788

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4
AF	0,414	-0,093	0,028	-0,064
EGase	0,344	0,246	0,214	0,032
EXP2	0,162	0,332	0,359	0,060
GAL	0,357	0,004	-0,099	0,343
PG	0,421	0,022	0,037	-0,159
PL	0,007	0,233	0,587	-0,069
PME	0,073	-0,340	0,082	0,655
XTH2	0,041	-0,578	-0,049	-0,089
XTH10	-0,007	-0,368	0,476	0,028
XYL	0,384	-0,084	-0,136	0,081
FFF	-0,384	0,077	-0,011	-0,025
Ethyl.prod.	0,138	0,347	-0,458	0,113
GAL.Akt.	0,241	-0,219	-0,073	-0,622
Eigenwert	2,251	1,527	1,339	1,015
Verteilung der Varianz	0,390	0,179	0,138	0,079
kumulative Verteilung	0,390	0,569	0,707	0,786

Tabelle A. 4: Gewichte der Variablen für die Hauptkomponentenanalyse 3 mit den Eigenwerten >1 und der Anteil der Verteilung, der durch die jeweilige Hauptkomponente (PC) erklärt wird.