

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Obstbau

Untersuchungen zu Fruchtfleischfestigkeit und Zellwandabbau von Apfel Früchten während der Lagerung unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Ethylen

Dominikus G. Kitemann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. J. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Treutter

2. Univ.-Prof. Dr. J.- N. Wünsche

(Universität Hohenheim)

Die Dissertation wurde am 07.12.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.02.2012 angenommen.

Meiner Familie und Magui gewidmet

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Dr. Josef Streif, für die Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit, für die gute, vertrauensvolle Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren und für das vermittelte Wissen im Bereich der Obstlagerung.

Auch bei meinem Doktorvater Prof. Dieter Treutter möchte ich mich ganz herzlich für die hilfreichen Anregungen und Vorschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit, aber vor allem auch für die sehr angenehme, offene und sympathische Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch allen meinen Kollegen vom Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee, vor allem Dr. Daniel Neuwald, Roswitha Slodczyk, Sabine Sonnentag, Renate Wirsing und Roy McCormick, die mich bei zahlreichen Analysen und der experimentellen Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Desweiteren gilt mein Dank Dr. Isabel Lara sowie Dr. Abel Ortiz-Catalán von der Universität in Lérida/Spanien für die Einführung in die biochemischen Methoden, Dr. Rosie Schröder von der Universität in Auckland/Neuseeland für die große Hilfe durch Ratschläge bei der Methodenentwicklung und besonders Dr. Jamil Harb sowie Omar Saleh von der Birzeit Universität in Palästina für die Durchführung eines Teils der molekulargenetischen Untersuchungen.

Auch allen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die hier nicht namentlich genannt werden, gilt mein herzlicher Dank.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir immer Rückhalt geben und für mich da sind, mich unterstützen und mir Kraft und Ermunterung in manchen Phasen dieser Arbeit geschenkt haben.

Von Herzen Danke ich auch besonders meiner Freundin Magui, die in letzter Zeit oft länger zu Hause auf mich warten musste, die immer ein offenes Ohr für mich hat und die mir manchmal geholfen hat, den Blick wieder auf andere Dinge zu richten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. Die Bedeutung der Fruchtfleischfestigkeit als Qualitätsattribut beim Apfel	3
2.2. Die Fruchtreife bei klimakterischen Früchten	4
2.2.1. Definition der Fruchtreife	4
2.2.2. Fruchtatmung (Respiration).....	6
2.2.3. Ethylenproduktion	7
2.2.3.1. Bedeutung von Ethylen für die Fruchtreife.....	7
2.2.3.2. Biosynthese und Wirkungsmechanismus von Ethylen	8
2.2.3.3. Inhibierung von Ethylensynthese und -wirkung	10
2.3. Der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit während der Fruchtreife	10
2.4. Die Bedeutung der Zellwand für die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	12
2.4.1. Aufbau der pflanzlichen Zellwand	12
2.4.2 Zellwandveränderungen während des Weichwerdens der Frucht	19
2.4.3. Aktivität zellwandabbauender Enzyme	22
2.4.3.1 Allgemeiner Überblick.....	22
2.4.3.2 Polygalacturonase (PG; endo-EC 3.2.1.15; exo-EC 3.2.1.67)	25
2.4.3.3 Pektatlyase (PL; EC 4.2.2.2)	28
2.4.3.4 Pektinmethylesterase (PME; EC 3.1.1.11).....	30
2.4.3.5 β -Galactosidase (β -Gal; EC 3.2.1.23).....	33
2.4.3.6 α -L-Arabinofuranosidase (AFase; EC 3.2.1.55).....	35
2.4.3.7 β -D-Endoglucanase (EGase; E.C. 3.2.1.4)	37

3.4.3.8 Xyloglucan-Endotransglycosylase (XET; E.C. 2.4.1.207)	38
2.4.3.9 β -Xylosidase (β -Xyl; EC 3.2.1.37)	41
3.4.3.10 Expansin (EXP)	43
2.5. Einflussfaktoren auf die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel.....	45
2.5.1 Vorernte Faktoren.....	45
2.5.2. Nacherntefaktoren.....	47
2.5.2.1 Temperatur und Luftfeuchte.....	47
2.5.2.2 Kontrollierte Atmosphäre (CA-Bedingungen)	48
2.5.2.3 Einsatz von 1-Methylcyclopropan (1-MCP).....	53
2.6. Ziel der Arbeit	57
3. Material und Methoden	59
3.1 Untersuchungen zur Fruchtreife und Fruchtqualität	60
3.1.1 Untersuchungen der Fruchtqualität	60
3.1.2 Messen der CO ₂ -Produktion während der Shelf-Life Phasen.....	61
3.1.3 Messen der Ethylenproduktion während der Shelf-life Phasen.....	62
3.1.4 Methode zu Festigkeitsmessungen in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe	62
3.1.5 Mineralstoffanalysen	63
3.2 Biochemische sowie molekulargenetische Methoden.....	63
3.2.1 Probenaufbereitung.....	63
3.2.2 Gewinnung des Zellwandmaterials und Zellwandfraktionierung.....	64
3.2.2.1 Extraktion des alkoholunlöslichen Zellwandmaterials.....	64
3.2.2.2 Extraktion der Pektinfraktionen.....	65
3.2.3 Methoden zur Bestimmung der Genexpression.....	66
3.2.3.1 Bestimmung der Genexpression zellwandabbauender Enzyme (I)	66
3.2.3.2 Bestimmung der Genexpression zellwandabbauender Enzyme (II)	68

3.3 Methodenentwicklung zur Bestimmung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme ..	69
3.3.1 Nachweis von Störfaktoren durch Proteinaufreinigung mittels Ultra-Filtration.....	71
3.3.2 Nachweis des Einflusses von Monosacchariden mittels Gelfiltration	73
3.3.3 Bestimmung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme.....	76
3.3.5.1 Erstellen des Enzymextrakts	76
3.3.5.2 Enzym-Aufreinigung mittels Gelfiltration	76
3.3.5.3 Messen der β -Galactosidase-Aktivität	77
3.3.5.4 Messen der Pektinmethylesterase-Aktivität.....	77
3.4 Durchführung der Lagerversuche	78
3.4.1 Untersuchungen zum Einfluss des Erntetermins.....	79
3.4.2 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur	80
3.4.3 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Lagerverfahren	80
3.4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Ca-Infiltrationen	81
3.4.5 Untersuchungen zum Einfluss von Ethylenbehandlungen	83
3.4.5.1 Untersuchungen mit der Sorte `Elstar`	84
3.4.5.2 Untersuchungen mit der Sorte `Golden Delicious`	85
3.4.6 Shelf-Life- Versuch bei 10°C.....	86
3.4.7 Methode zur 1-MCP- Applikation	86
3.5 Statistische Auswertung	87
4 Ergebnisse.....	88
4.1 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Fruchtfleischfestigkeit.....	88
4.1.1 Fruchtfleischfestigkeit in Abhängigkeit der Fruchtfleischtiefe und der Sorte.....	88
4.1.2 Einfluss des Erntetermins.....	91
4.1.3 Einfluss der Lagermethode	94
4.1.4 Einfluss von 1-MCP.....	97

4.1.5 Einfluss der Temperatur.....	100
4.1.6 Einfluss von Calcium.....	103
4.1.7 Einfluss von Ethylen	105
4.2 Einflussfaktoren auf die Fruchtreife	106
4.2.1 Einfluss der Sorte	106
4.2.2 Einfluss des Erntetermins.....	109
4.2.3 Einfluss der Lagermethode	111
4.2.4 Einfluss von 1-MCP.....	114
4.2.5 Einfluss von Calcium.....	117
4.2.6 Einfluss von Ethylen	118
4.3 Einfluss von Sorte und Lagerfaktoren auf die Genexpression zellwandabbauender Enzyme	122
4.3.1 Einfluss der Sorte	123
4.3.2 Einfluss der Lagermethode	124
4.3.3 Einfluss von 1-MCP.....	125
4.3.4 Einfluss von Calcium.....	129
4.4 Einfluss von Sorte und Lagerfaktoren auf die Aktivität zellwandabbauender Enzyme	131
4.4.1 Einfluss der Sorte	131
4.4.2 Einfluss der Lagermethode	131
4.4.3 Einfluss von 1-MCP.....	133
4.4.4 Einfluss von Calcium.....	135
4.5 Einfluss von Sorte und Lagerfaktoren auf die Pektinfraktionen der Zellwand	139
4.5.1 Einfluss der Sorte	139
4.5.2 Einfluss der Lagermethode	140
4.5.3 Einfluss von 1-MCP.....	142

4.5.4 Einfluss von Calcium.....	145
5 Diskussion	147
5.1 Unterschiede zwischen den Sorten bezüglich Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau	149
5.2 Einfluss der Lagermethode auf Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau.....	162
5.3 Einfluss von Ethylen und 1-MCP auf Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau	174
5.4 Einfluss von Calcium auf Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau	183
5.5 Fazit der Diskussion	191
6 Zusammenfassung.....	200
8 Literaturverzeichnis.....	208

Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen

PG	Polygalacturonase
PL	Pectatlyase
PME	Pektinmethylesterase
β -Gal	β -Galactosidase
AFase	α -L-Arabinofuranosidase
EGase	1,4- β -D-Endoglucanase
XET	Xyloglucan-Endotransglycosylase
β -Xyl	β -Xylosidase
Exp	Expansin
HGA	Homogalacturonan
RG	Rhamnogalacturonan
PAW	phenol : acetic acid : water
AIR	alcohol insoluble residue
TSS	total soluble solids
CA	controlled atmosphere
ULO	ultra low oxygen
DCA	dynamic controlled atmosphere
1-MCP	1-Methylcyclopropen

1. Einleitung

Obst stellt heutzutage ein global gehandeltes Produkt dar. Die Vielfalt an Obstsorten in den Supermärkten und im Lebensmitteleinzelhandel ist ebenso umfangreich wie die Zahl der jeweiligen Herkunftsländer. Entwicklungen im Bereich der Qualitätserhaltung auf dem Weg vom Produzenten zum Verbraucher machen es heute möglich, dem Konsumenten über das ganze Jahr eine breite Palette an frischem Obst anzubieten. Fortschritte im Bereich der Qualitätserhaltung sowie eine starke Konkurrenz im Lebensmitteleinzelhandel haben in den vergangenen Jahrzehnten jedoch nicht nur zu einer Verbesserung des Angebotes sowie zu einer kontinuierlichen Belieferung des Marktes beigetragen, sondern auch zu strengen Qualitätsstandards geführt, so dass es für den Anbauer zunehmend schwieriger wird, den Anforderungen des Marktes gerecht zu werden (Johnston et al., 2002a). Im Jahr 1967 wurden für Westdeutschland die EWG-Qualitätsnormen zur Regelung gemeinsamer Qualitätsstandards zwischen den damaligen EWG-Mitgliedsländern eingeführt. Diese Normen wurden für Äpfel seitdem mehrmals angeglichen, so zuletzt am 07. Juni 2011, umfassen jedoch nur äußere Qualitätsmerkmale der Äpfel. Die Richtlinien der Vermarkter und des Handels hingegen geben je nach Qualitätsklasse und Absatzweg spezifische, die innere sowie äußere Qualität betreffende Richtlinien vor. So werden zum Beispiel im Sortenprofil der Marktgemeinschaft Bodenseeobst für `Braeburn` in der schwächeren Klasse I ("Tafelobst") Penetrometerwerte von mindestens 5,0 kg/cm², ein Flächenanteil an Deckfarbe von mehr als 10% sowie Zuckergehalte über 10° Brix vorgeschrieben, wogegen die Ware für Premiumqualität ("Symphonie vom Bodensee") mindestens eine Festigkeit von 7,0 kg/cm², mehr als 60 % Deckfarbe sowie über 13,5° Brix vorzuweisen hat (Quelle: Marktgemeinschaft Bodenseeobst, 2011).

Entwicklungen in der Lagertechnik, wie die Einführung der Lagerung in "kontrollierter Atmosphäre" (controlled atmosphere = CA) bzw. bei "extrem niedrigem Sauerstoff" (ultra low oxygen = ULO), die Weiterentwicklung zur "dynamischen CA-Lagerung" (dynamic controlled atmosphere = DCA) oder der Einsatz von Reifeinhibitoren wie 1-Methylcyclopropen (1-MCP) haben entscheidend zur Verbesserung der Lagermöglichkeiten beigetragen. Dennoch betragen nach Kader (2007) die geschätzten

Nachernteverluste in entwickelten Ländern immer noch zwischen 5% und 25%, in Entwicklungsländern sogar bis zu 50%.

Maßnahmen zur Qualitätserhaltung zielen darauf ab, die während der Reife ablaufenden Prozesse zu steuern und dadurch, unter anderem, die Fruchtfleischfestigkeit zu erhalten.

Die Fruchtfleischfestigkeit stellt vor allem bei Kernobstarten, wie dem Apfel, eines der wichtigsten Qualitätskriterien dar, da sie gewisse Textureigenschaften wie Knackigkeit, Saftigkeit, aber auch eine geringere Empfindlichkeit der Frucht für mechanische Beschädigungen garantiert (Siddiqui et al., 1996). In Befragungen in der Schweiz zum Beispiel nannten neben Aroma (77%) und Saftigkeit (71%) 73% der Befragten die Fruchtfleischfestigkeit als eines der für sie wichtigsten Qualitätsattribute beim Apfel (Höhn et al., 2007). Neben sortentypischer Ausprägung, Makellosigkeit der Frucht sowie ausreichender Deckfarbe gilt für den Markt immer mehr die Fruchtfleischfestigkeit als wichtiges Kriterium, um dem Kunden das ganze Jahr über Ware mit den geforderten Textureigenschaften anbieten zu können (Johnston et al., 2002a).

Trotz intensiver Forschung zum Thema Fruchtfleischfestigkeit sowie zur Wirkung von Vorernte-, Ernte- und Nacherntefaktoren auf die Textureigenschaften einer Frucht sind die biochemischen und physiologischen Ursachen für deren Wirkung noch teilweise ungeklärt.

2. Literaturübersicht

2.1. Die Bedeutung der Fruchtfleischfestigkeit als Qualitätsattribut beim Apfel

Die Fruchtfleischfestigkeit stellt beim Apfel eines der bedeutendsten Qualitätsmerkmale dar, da sie zum einen die Akzeptanz am Markt bzw. beim Konsumenten bestimmt, andererseits auch für die Haltbarkeit der Frucht von entscheidender Bedeutung ist. Bei der Bestimmung des optimalen Erntetermins von Äpfeln wird die Fruchtfleischfestigkeit neben dem Stärkegehalt der Frucht sowie dem Gehalt an löslicher Trockensubstanz (~Zuckergehalt) als Qualitätsattribut zur Berechnung des Reife- oder "Streifindex" verwendet. Dabei gibt es für jede Sorte Festigkeitswerte, innerhalb derer sich das optimale Erntefenster bewegt (Streif, 1983).

Die Bedeutung der Fruchtfleischfestigkeit für den Konsumenten konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden. Untersuchungen in der Schweiz zeigten, dass die vom Konsumenten als optimal empfundene Fruchtfleischfestigkeit je nach Sorte deutlich variieren kann und dass für das Empfinden der optimalen Qualität durch den Konsumenten die Fruchtfleischfestigkeit nicht einzeln, sondern in Verbindungen mit anderen Qualitätsattributen, wie z.B. dem Zucker/Säure-Verhältnis der Frucht zu sehen ist (Höhn et al., 2007). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie mit verschiedenen Apfelsorten in den USA (Harker et al., 2008). Dabei konnte die Fruchtfleischfestigkeit als wichtigstes Qualitätsmerkmal für die Genussqualität bei Äpfeln definiert werden, wobei auch hier, je nach Sorte, ein deutlicher Zusammenhang zwischen Festigkeit, Zucker- und Säuregehalt beobachtet wurde. Nach Höhn et al. (2001) ermöglichen instrumentelle Messungen des Gehaltes an löslicher Trockensubstanz, an titrierbarer Säure sowie der Fruchtfleischfestigkeit bei einigen Sorten eine Vorhersage der Akzeptanz durch den Konsumenten.

Laut Redgwell et al. (2002) spielt für die Wahrnehmung der Textureigenschaften einer Frucht vor allem die Beschaffenheit der Zellwände sowie ihre strukturelle Unversehrtheit eine wichtige Rolle. Die Intaktheit des Zellgewebes kann vor allem auf die Adhäsion benachbarter Zellen sowie die Stabilität der Primärwand zurückgeführt werden. Die Adhäsion

benachbarter Zellwände wurde als einer der entscheidendsten Einflussfaktoren für das Texturempfinden beschrieben (Diehl und Hamann, 1980; Pitt und Chen, 1983). Diese wird vor allem durch die Festigkeit der Mittellamelle, der Kontaktfläche zwischen den Zellen, sowie durch das Ausmaß plasmodesmischer Verbindungen bestimmt (Harker und Hallet, 1994). Das Empfinden der Textur einer Frucht im Mund hängt nach Harker et al. (1997) davon ab, wie sich das Zellgewebe beim Durchbeißen deformiert bzw. trennt. Er unterscheidet dabei drei verschiedene Möglichkeiten:

- a) Die Zelle bricht durch deren äquatoriale Mitte, worauf abrupt Zellsaft freigesetzt wird (Zell-Fraktur).
- b) Nur ein Teil der Zelle bricht beim Durchbeißen des Gewebes, die Zelle kollabiert und Zellsaft wird freigesetzt (Brechen von Zellteilen).
- c) Intakte Zellen trennen sich voneinander ohne dass dabei die Zelle zerstört wird. Es wird kein Zellsaft freigesetzt (Lösen der Adhäsion benachbarter Zellen).

Während der Fruchtreife von Äpfeln ändert sich der Mechanismus des Gewebebruchs von der anfänglichen Zellfraktur (a) zum teilweisen Brechen und Kollabieren der Zellen (b) und bei sehr reifen Früchten zur Gewebetrennung durch Lösen der Adhäsion benachbarter Zellen (c) (Harker et al., 1997). Die sensorische Wahrnehmung verändert sich dabei von einer anfänglich saftigen, knackigen zu einer mehligem, trockenen Frucht.

2.2. Die Fruchtreife bei klimakterischen Früchten

2.2.1. Definition der Fruchtreife

Als Fruchtreife wird das Übergangsstadium zwischen Fruchtwachstum und der Fruchtalterung (Seneszenz) bezeichnet. Es handelt sich dabei um physiologische und biochemische Veränderungen, welche letztendlich zur Genießbarkeit der Frucht führen. Der Entwicklungsprozess der Fruchtreife lässt sich in zwei Phasen unterteilen, der Stoffeinlagerung oder Qualitätsbildung (engl. maturation) sowie der physiologischen

Fruchtreife (ripening) (Stoll 1997; Streif, 2002). Nach Alexander und Grierson (2002) können bei nicht-klimakterischen Früchten (z.B. Erdbeeren, Trauben) beide Entwicklungsprozesse synchron ablaufen, das heißt die Frucht erreicht ihre Genussreife zum Zeitpunkt der Pflückreife. Bei diesen Früchten erfolgt nach der Ernte keine Nachreife. Bei klimakterischen Früchten (z.B. Apfel, Birne) hingegen sind beide Entwicklungsabschnitte deutlich getrennt zu betrachten. Während der Qualitätsbildung (maturation) wird die stoffliche Grundlage für gute Qualität gelegt.

Die Stoffeinlagerung hängt von mehreren Faktoren ab, wie zum Beispiel den vorherrschenden Assimilationsbedingungen oder dem Fruchtbehang, da diese den Aufbau von Zuckern, Säuren und anderen Inhaltsstoffen qualitativ und quantitativ beeinflussen. Die Phase der Stoffeinlagerung endet mit dem Stadium der Pflückreife, bei dessen Erreichen die Frucht morphologisch bereits voll ausgebildet ist. Während der physiologischen Fruchtreife entwickelt sich die zunächst unreife Frucht zu einer reifen, genießbaren Frucht (Genussreife). Dabei wird unter anderem Aroma gebildet und die Fruchtfleischfestigkeit nimmt ab. Dieser Vorgang beginnt bereits vor der Ernte am Baum und setzt sich nach dieser fort. Der optimale Erntetermin der Früchte sollte so gewählt werden, dass der Prozess der Qualitätsbildung und der Reifeprozess soweit fortgeschritten sind, dass die Früchte auch nach Langzeitlagerung normal ausreifen und optimale Geschmacksqualität aufweisen (Streif, 2002).

Klimakterische Früchte, wie Äpfel, Birnen oder Pfirsiche, zeichnen sich durch einen deutlichen Anstieg der Ethylenbildung sowie der Atmungsintensität während der Fruchtreife aus (Kader, 2002). Dieser Anstieg wird als Klimakterium bezeichnet (Kidd und West, 1925). Desweiteren erfolgt während der Fruchtreife in der Regel eine Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit, der Abbau von Stärke bzw. die Einlagerung von Kohlenhydraten (Zuckern), der Abbau von organischen Säuren und phenolischen Verbindungen sowie der Aufbau von Aromastoffen (Friedrich und Fischer, 2002; Kader, 2002; Watkins, 2002; Taiz und Zeiger, 2007). Desweiteren führt bei vielen Früchten wie z.B. dem Apfel der Abbau von Chlorophyll zu Farbveränderungen der Fruchtschale von Grün nach Gelb (Streif, 2002).

2.2.2. Fruchtatmung (Respiration)

Die Fruchtatmung dient zur Versorgung der Frucht mit energiereichen Verbindungen und den erforderlichen Kohlenstoffgerüsten zur Erhaltung der Zellfunktionen und der Syntheseprozesse und stellt somit einen bedeutenden Stoffwechselprozess auch während der Lagerung von Obst dar (Turner und Turner, 1975; Kays, 1991). Während die Frucht am Baum über die Blätter mit Assimilaten versorgt wird, erfolgt nach der Ernte die Aufrechterhaltung der Stoffwechselprozesse vor allem durch den Abbau von eingelagerten Kohlenhydraten und organischen Säuren zu Kohlendioxid (CO_2) und Wasser (H_2O).

Die Atmung lässt sich in drei Abschnitte gliedern: die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus sowie die Atmungskette oder oxidative Phosphorylierung (Mir und Beaudry, 2002; Taiz und Zeiger, 2007). Bei der Glykolyse werden im Cytosol Kohlenhydrate gespalten, das heißt Glucose wird abgebaut, wobei Pyruvat sowie Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) entsteht. Im weiteren Schritt, dem Zitronensäurezyklus, erfolgt die Oxidation dieser Kohlenhydrate in den Mitochondrien. Dabei entstehen neben CO_2 die Reduktionsäquivalente NADH_2 und FADH_2 . Im dritten Schritt, der oxidativen Phosphorylierung, werden Elektronen sowie daran gebundener Wasserstoff, welcher aus dem Zitronensäurezyklus (NADH_2 , FADH_2), dem Abbau von Fettsäuren sowie aus der Glykolyse stammt, in einer Reihe von Redoxvorgängen dazu genutzt, aus ADP und Phosphat Energie in Form von ATP aufzubauen. Der Wasserstoff wird dabei an Sauerstoff gebunden und es entsteht Wasser (Mohr und Schopfer, 1992; Mir und Beaudry, 2002; Helmich, 2003; Taiz und Zeiger, 2007). Die während der Respiration als ATP entstandene Energie deckt den für den Stoffwechsel der Früchte notwendigen Energiebedarf. Überschüssige Energie wird als Atmungswärme abgegeben. Diese stellt bei der Lagerung der Früchte eine bedeutende technische Größe dar, da sich nach ihr unter anderem die Leistung der benötigten Kälteanlage richtet (Streif, 2002). Bei Sauerstoffmangel läuft die Atmung den Weg der alkoholischen Gärung. Dabei entstehen während der Glykolyse aus Pyruvat neben weiteren Zwischenprodukten Ethanol und CO_2 (Mohr und Schopfer, 1992). Der Gärungsstoffwechsel dient dazu, bei Hemmung des Elektronentransports und der oxidativen Phosphorylierung die Glykolyse weiterhin aufrecht zu erhalten und somit durch Bereitstellung von ATP aus der Substratphosphorylierung das Überleben des Pflanzengewebes noch eine Weile zu sichern

(Davies et al., 1974; Perata und Alpi, 1993). Dies kann unter Umständen zu Fruchtfleischverbräunungen in Folge von Zellschädigungen sowie zu alkoholischem Fremdgeschmack der Früchte führen (Streif, 2002). Nach (Kidd und West, 1925) ist die Atmungsintensität bei einer jungen Frucht sehr hoch. Zur Ernte hin erfolgt eine Abnahme bis kurz vor der Ernte das Minimum erreicht wird. Bei klimakterischen Früchten wie zum Beispiel Äpfel oder Birnen kann nach der Ernte im Normalfall ein starker Anstieg der Atmung bis zum sogenannten klimakterischen Maximum beobachtet werden. Anschließend erfolgt während der Lagerung eine stetige Abnahme der Atmungsintensität bis kurz vor dem Zelltod nochmals ein kleiner Anstieg auftritt.

Somit gibt die Höhe der Atmungsintensität Hinweise auf den Reifezustand der Frucht.

Nach Kader (2007) ist die Haltbarkeit einer Frucht meistens proportional zu deren Atmungsintensität. Demnach zeichnen sich bei klimakterischen Früchten solche mit geringerer Atmungsintensität in der Regel durch eine bessere Haltbarkeit aus. Ziel verschiedener Lagerverfahren ist es unter anderem, durch Reduzierung der Fruchtatmung die Haltbarkeit zu verlängern. Nach Kays (1991) veratmen Äpfel im Verlauf der Lagerung zunächst bevorzugt Säuren, so dass deren Gehalt je nach Lagerbedingungen auf die Hälfte oder mehr reduziert wird. Anschließend dienen vor allem Kohlenhydrate als Atmungssubstrat. Zudem ist der Zuckergehalt im Apfel ca. 10mal höher als der Gehalt an Säuren (Hecke et al., 2006), so dass sich trotz des Abbaus von Zuckern dieser weniger bemerkbar macht.

2.2.3. Ethylenproduktion

2.2.3.1. Bedeutung von Ethylen für die Fruchtreife

Das Phytohormon Ethylen besitzt bei den meisten Pflanzen große Bedeutung für die Regulierung verschiedener Wachstums-, Entwicklungs- oder Seneszenz-Prozesse. Während der Fruchtreife ist Ethylen vor allem für die Steuerung der Reife von entscheidender Bedeutung. Ethylen ist bereits in sehr geringen Konzentrationen (< 0,1ppm) physiologisch aktiv (Reid, 2002). Klimakterische Früchte, wie Apfel, Birne, Pfirsich usw. zeigen zu Beginn der Fruchtreife einen typischen Anstieg der Ethylenbildung sowie Respirationsrate (Kidd und

West, 1925; Biale, 1960; Kader, 2002; Watkins, 2002; Taiz und Zeiger, 2007). Dennoch gibt es nach Kader (2002) keine klare Beziehung zwischen der Ethylenbildungs-Kapazität einer Art bzw. Sorte und deren Haltbarkeit. Bei den meisten Obst- und Gemüsearten beschleunigt Ethylen den Reife- sowie den Alterungsprozess. Generell steigt die Ethylenbildungsrate mit zunehmendem Reifegrad. Zudem kann das Auftreten mechanischer Beschädigungen, physiologischer oder parasitärer Fruchtkrankheiten, ein Anstieg der Temperatur oder sonstiger physiologischer Stress zu einem Anstieg der Ethylenproduktion führen. Niedrige Temperaturen sowie erhöhte CO₂-Konzentrationen oder niedrige Sauerstoffkonzentrationen in der Atmosphäre können hingegen die Ethylenbildungsrate wie auch die Ethylenwirkung reduzieren (Kader, 2002).

2.2.3.2. Biosynthese und Wirkungsmechanismus von Ethylen

Lieberman und Mapson (1964) konnten erste Hinweise liefern, dass es sich bei der Aminosäure Methionin um die Vorstufe von Ethylen handelt. Im ersten Schritt der Ethylenbiosynthese erfolgt zunächst die Umwandlung von Methionin zu S-Adenosylmethionin (SAM), wie Burg und Clagett (1967) nachweisen konnten. Im zweiten Schritt wird SAM in 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) umgewandelt. Dieser Prozess wird durch die ACC-Synthase (ACS) katalysiert. In einem weiteren Schritt erfolgt die Umwandlung von ACC zu Ethylen mit Hilfe der ACC-Oxidase (ACO) (Kende, 1989; Kende, 1993). Die Aktivität beider Enzyme wird durch Umweltbedingungen, einschließlich Temperatur, O₂- und CO₂- Gehalt in der Atmosphäre beeinflusst (siehe Kapitel 2.5) (Kader, 2002, Watkins, 2002). Nach Adams und Yang (1979) wird bei zwei Schritten der Ethylenbiosynthese Sauerstoff benötigt: für die Synthese von ATP im Zuge der Atmung, was für die Aktivierung von Methionin notwendig ist, sowie für den oxidativen Abbau von ACC zu Ethylen. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Umwandlung von SAM in ACC mittels ACS den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt auf diesem Syntheseweg darstellt (McKeon et al., 1995). Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass der Gehalt an ACC sowie die Aktivität von ACS sowie ACO während der Fruchtreife zunehmen. Folglich kann ein Anstieg der Ethylenbiosynthese beobachtet werden. Bei der Ethylenbiosynthese handelt es sich um

einen autokatalytischen Prozess, das heißt das gebildete Ethylen stimuliert wiederum dessen erneute Biosynthese. Diese positive Rückkopplungsschleife der Ethylenbiosynthese bewirkt bei klimakterischen Früchten das Reifen der gesamten Frucht, sobald die Reifeprozesse einmal induziert wurden. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Behandlung mit Ethylen bei nicht-klimakterischen Früchten zwar einen Anstieg der Respiration in Folge erhöhter Ethylenkonzentrationen, jedoch wird dadurch in der Regel nicht die Bildung von endogenem Ethylen bzw. ein Beschleunigen der Reifevorgänge ausgelöst (Taiz und Zeiger, 2007).

Nach Binder und Bleeker (2003) handelt es sich bei der Wirkungsweise von Ethylen um einen negativ regulierten Prozess. In der Zellmembran befindet sich eine Gruppe von Ethylenrezeptoren (ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 und ERS2). Manche dieser Rezeptoren wirken direkt, manche indirekt auf die sogenannte Serin-Threonin-Kinase (CTR1), ein Protein, das wiederum ein weiteres Protein, EIN2, aktivieren bzw. inaktivieren kann. EIN2 spielt eine essentielle Rolle für das Auslösen ethylengekoppelter Reifeprozesse. Bei Abwesenheit von Ethylen befinden sich die Rezeptoren ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 und ERS2 in aktivem, inhibitorischem Zustand, wodurch das CTR1 Protein aktiviert wird, was wiederum zu einer Inaktivierung von EIN2 führt. Bindet sich Ethylen an die Rezeptoren, kommt es zu einer Inaktivierung von CTR1 und einer folglich Aktivierung von EIN2. Die Expression reifebezogener Gene, welche zum Beispiel für die Synthese bestimmter Zellwand abbauender Enzyme kodieren, wird dadurch induziert (Binder und Bleeker, 2003).

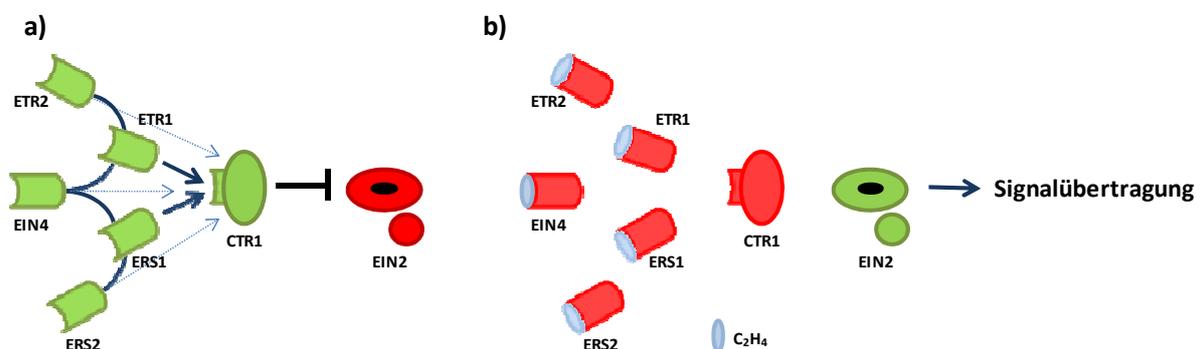


Abbildung 1: Ethylenrezeptor-Modell nach Binder und Bleeker 2003: Bei geringen Ethylenkonzentrationen aktivieren die unbesetzten Rezeptoren CTR1, wodurch EIN 2 inaktiviert wird (a); durch Bindung von Ethylen an die Rezeptoren kommt es zur Inaktivierung von CTR1, folglich zur Aktivierung von EIN 2 und somit zur Stimulierung der Reifeprozesse (b).

2.2.3.3. Inhibierung von Ethylensynthese und -wirkung

Neben Ethylen-fördernden Maßnahmen im Vorerntebereich, wie z.B. dem Einsatz von Ethephon (2-Chlorethylphosphonsäure) zur Behangsregulierung, spielen im Nacherntebereich bzw. zur Ernte vor allem Möglichkeiten zur Inhibierung der Ethylenbiosynthese und -wirkung eine bedeutende Rolle. Aminoethoxyvinylglycin (AVG) (Handelsname Retain®) zum Beispiel blockiert durch Inhibierung der ACS die Umwandlung von SAM in ACC (Cuadrado et al., 2004). Niedrige O₂-Gehalte in der Atmosphäre können z.B. die Aktivität der ACC-Oxidase hemmen und somit ebenfalls die Bildung von Ethylen unterdrücken (siehe Kapitel 2.5.2.2). Inhibitoren der Ethylenwirkung beeinflussen nicht die Synthese, sondern den Wirkungsmechanismus des Phytohormons, bzw. können die Empfindlichkeit gegenüber Ethylen verringern. Das momentan bekannteste Beispiel aus dem Nacherntebereich ist dabei der Wirkstoff 1-Methylcyclopropen (1-MCP) (Handelsname SmartFresh™), welcher die Ethylenrezeptoren blockieren und somit eine Bindung des Ethylenmoleküls an diesen Stellen verhindern kann (siehe Kapitel 2.5.2.3) (Kader et al., 2002; Watkins, 2002; Taiz et al., 2007; Streif, 2008). Eine weitere Möglichkeit zur Inhibierung sowohl der Ethylensynthese wie auch dessen Wirkung ist der Einsatz molekulargenetischer Verfahren. Bei Tomaten konnte zum Beispiel durch Expression einer Antisense-Variante entweder der ACC-Synthase oder -Oxidase zur Eliminierung der Ethylenbiosynthese und zur kompletten Blockierung der Reifevorgänge führen. Erst nach Applikation von externem Ethylen wurde die Reife wieder in Gang gesetzt (Oeller et al., 1991). Dies zeigt die Notwendigkeit des Ethylens für die klimakterische Fruchtreife.

2.3. Der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit während der Fruchtreife

Bourne (1979) teilte Früchte aus gemäßigten Klimaten bezüglich ihrer Festigkeitseigenschaften in zwei Gruppen ein: Früchte, welche während ihrer Reife weiche Textureigenschaften erreichen (z.B. Pflaumen, Tomaten, Kiwifrüchte) sowie Früchte, welche sich durch eine knackige Textur auszeichnen (z.B. Äpfel). Früchte aus erst genannter Gruppe weisen ein Gewebe mit schwacher interzellulärer Bindung auf, das bei minimaler Zerstörung

der Zellen getrennt werden kann. Früchte aus zweiter Gruppe zeigen deutlich festere Verbindungen zwischen den Zellen. Durch das Brechen der Zellen ergibt sich dabei die als knackig empfundene Textureigenschaft (Bourne, 1979; Harker et al., 1997). Batisse et al. (1996) konnten an Kirschen mit geringer Fruchtfleischfestigkeit eine dennoch intaktere, besser erhaltene Mittellamelle beobachten als bei noch knackigen Früchten. Dies weist darauf hin, dass Texturveränderungen während der Fruchtreife auch auf Veränderungen der inneren Zellwandschichten (Primärwand) zurückzuführen sind.

Beim Apfel folgt der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit bei den meisten Sorten einer nicht linearen Kurve, die nach Johnston et al. (2002a) in drei Phasen unterteilt werden kann (siehe Abb. 2). Während der ersten Phase kann in der Regel ein sehr geringer Abbau der Festigkeit beobachtet werden, in Phase II hingegen verliert die Frucht deutlich an Festigkeit, während in Phase III wiederum nur sehr geringe Veränderungen festzustellen sind. Bei den meisten Apfelsorten erreicht der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit Minimalwerte zwischen ca. 35 und 40 N, danach ist in der Regel keine weitere Abnahme zu beobachten. Maßnahmen zum Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit zielen vor allem darauf ab, das Weichwerden der Frucht in möglichst frühem Stadium (Phase I) zu verzögern.

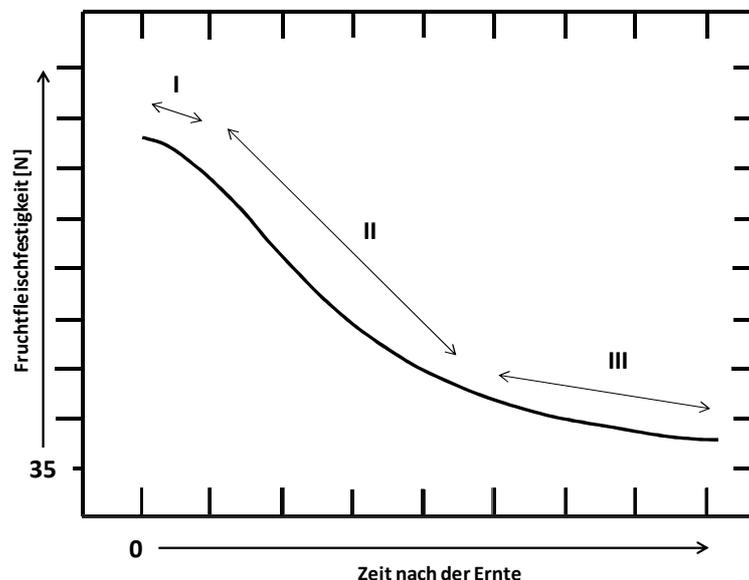


Abbildung 2: Typisches Festigkeitsprofil sowie 3 Phasen der Festigkeitsveränderung für Apfelfrüchte bei 0-5°C Lagertemperatur (nach Johnston et al., 2002a).

Als Ursache für die Texturbeschaffenheit einer Frucht bzw. deren Festigkeitsverlust während der Reife können eine Reihe von Faktoren, wie die Fruchtanatomie und Beschaffenheit der Zellen, Zellwandveränderungen während der Fruchtreife sowie der Verlust des Zell-Turgors genannt werden (Knee and Bartley, 1981; Fischer und Bennett, 1991; Siddiqui and Bangerth, 1996; Peña and Carpita, 2004). Auch die Bedeutung der Calciumversorgung einer Frucht für deren Textureigenschaften konnte in zahlreichen Studien untersucht werden (Bangerth et al., 1972; Poovaiah et al., 1988; Ferguson und Watkins, 1989; Song und Bangerth, 1993).

2.4. Die Bedeutung der Zellwand für die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel

2.4.1. Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Die pflanzliche Zellwand ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut, wie Abbildung 3 zeigt.

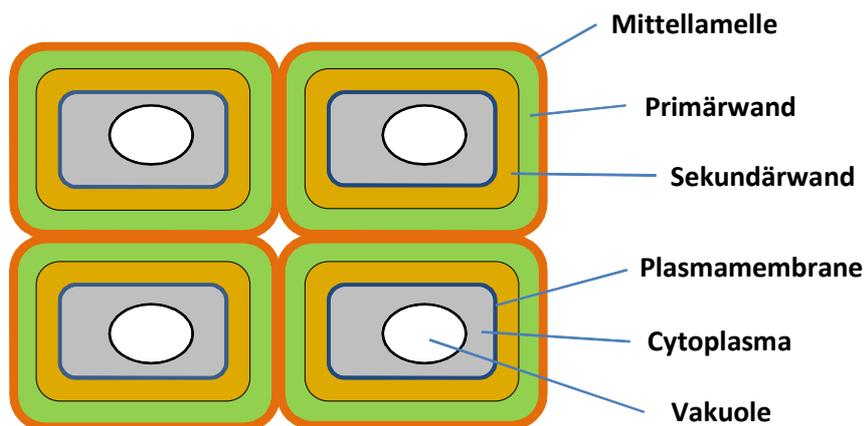


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der pflanzlichen Zellwand .

Die äußerste Schicht, die **Mittellamelle**, stellt die Verbindungsschicht zwischen den einzelnen Zellen dar und ist somit von entscheidender Bedeutung für den Zusammenhalt der Zellverbände. Im Gegensatz zum Rest der Zellwand besteht sie überwiegend aus Pektinen zusammen mit verschiedenen Proteinen und entsteht während der Zellteilung aus der Zellplatte (Jarvis, 1984; Carpita und Gibeaut 1993; Jarvis et al., 2003). Der Abbau der Mittellamelle während der Fruchtreife führt zum Auflösen dieser Verbindungen und somit zum Verlust der Gewebestabilität (Harker et al., 1997; Waldron et al., 1997).

Die nächste Schicht, die **Primärwand**, entsteht während der Zellstreckungsphase. Sie besteht zu ca. 25% der Trockenmasse aus Zellulose, welche in Form von Mikrofibrillen in eine hydratisierte Matrix eingebettet ist. Diese Matrix setzt sich aus zwei Hauptgruppen von Polysacchariden, aus Pektinen und Hemizellulosen, sowie aus sogenannten Strukturproteinen (überwiegend Glycoproteinen) zusammen. Dieser Aufbau verleiht der Primärwand eine Fieberglas ähnliche Struktur, welche sich durch Elastizität und Reißfestigkeit, aber auch plastische Verformbarkeit auszeichnet, so dass ein Ausdehnen der Primärwand während der Zellstreckungsphase ermöglicht wird (Mohr und Schopfer, 1992; Taiz und Zeiger, 2007).

Die Zusammensetzung der Matrixpolysaccharide variiert je nach Zelltyp und Pflanzenart. Die Bezeichnung dieser Polysaccharide richtet sich nach dem Hauptzucker, den sie enthalten. So handelt es sich bei Xyloglucan z.B. um ein Glucangerüst, also einer Kette aus Glucosebausteinen, mit Xylose-Zuckern an den Seitenketten. Die Dicke der Primärwand beträgt zwischen 0,1 und 1 μm (Mohr und Schopfer, 1992; Taiz und Zeiger, 2007).

Die als nächstes angrenzende Schicht wird als **Sekundärwand** bezeichnet. Sie wird, sobald die Zelle ihre endgültige Größe und Gestalt erreicht hat, an die Primärwand angelagert. Sie ist deutlich dicker als die Primärwand und enthält kein Pektin, sondern besteht zu ca. 90% aus Zellulose (Wächtershäuser, 2003). Sekundärwände kommen nicht in allen pflanzlichen Zellwänden vor. So besitzen zum Beispiel in Früchten vorkommende Zellwände in der Regel keine Sekundärwand (Fischer, 1993).

Wie bereits erwähnt besteht die pflanzliche Zellwand überwiegend aus den Polysacchariden Zellulose, Hemizellulose und Pektin sowie aus sogenannten Strukturproteinen. Abbildung 4 stellt schematisch die Verknüpfung der verschiedenen Polysaccharide in der Zellwand dar. Im Folgenden sollen diese Bestandteile genauer beschrieben werden.

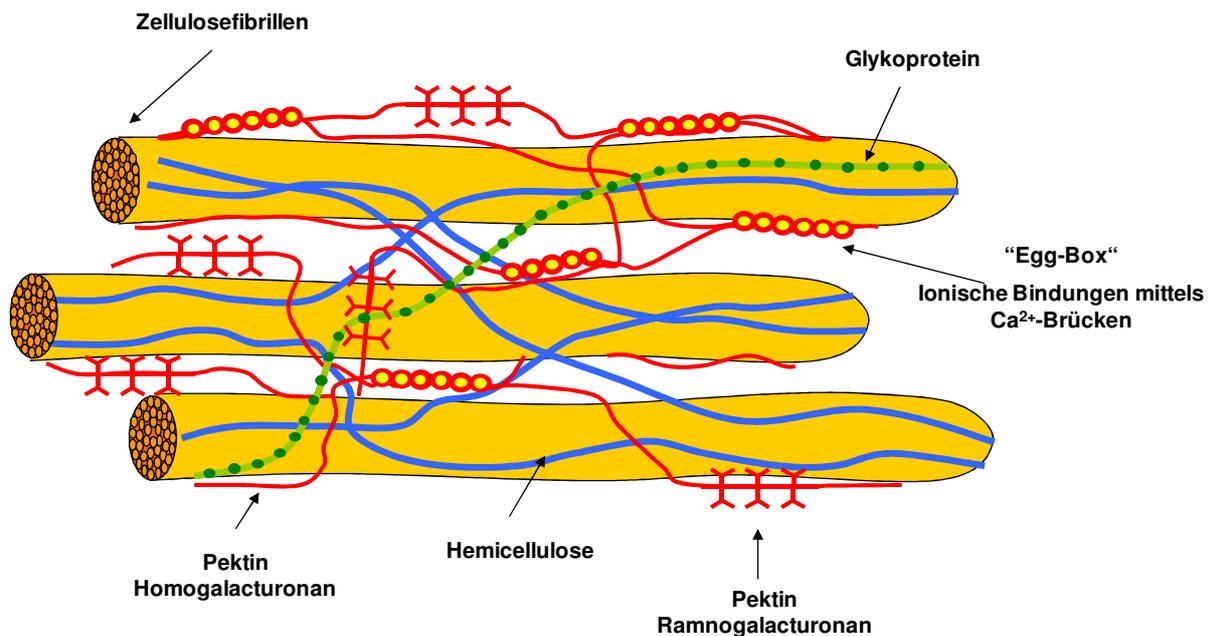


Abbildung 4: Verteilung und Funktion verschiedener Polysaccharide in der pflanzlichen Zellwand (verändert nach: www.voneinanderlernen.uni-kiel.de; Stand 15.04.2011).

Zellulose

Zellulose stellt den Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand dar. Sie ist damit das in der Natur am häufigsten vorkommende Polysaccharid. Ihr Anteil an den gesamten organischen Kohlenstoffverbindungen in der Biosphäre beträgt mehr als 50%, wodurch sie eine bedeutende Rolle im Kohlenstoffkreislauf unseres Ökosystems spielt. Die Zellulosemoleküle liegen in der Zellwand gebündelt als kompakte Mikrofibrillen vor, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammen gehalten werden. Die Einzelstränge dieser Mikrofibrillen bestehen aus 2000 bis über 25000 (1,4)-glykosidisch miteinander verbundenen Glucoseeinheiten, ihre Länge beträgt zwischen 1 und 5 μm (Brown et al., 1996). 60 bis 100 solcher Glucoseketten bilden eine Mikrofibrille. Die Bildung der Zellulosemikrofibrillen erfolgt in der Plasmamembran in sogenannten Rosetten- oder Terminal-Komplexen.

Durch die Bündelung dieser Stränge besitzt die Zellulose eine hohe, mit Stahl vergleichbare Zugbelastbarkeit. Zellulose ist überwiegend unlöslich, chemisch stabil und relativ unempfindlich gegen chemischen sowie enzymatischen Abbau und stellt somit ein optimales

Strukturmaterial für eine stabile Zellwand dar. Der Anteil der Zellulose in der Primärwand beträgt ca. 25% (Carpita und McCann, 2000; Redgwell und Fischer, 2002; Taiz und Zeiger, 2007).

Hemizellulose

Bei den Hemizellulosen handelt es sich um ein heterogenes Gemisch verschiedener Polysaccharide, dessen Zusammensetzung je nach Pflanzenart variieren kann. Bei Dikotyledonen besteht die Hemizellulosefraktion hauptsächlich aus Xyloglucan, 1,4 β -verknüpften Glucoseketten, an denen sich, im Gegensatz zur Zellulose, kurze Seitenketten befinden, welche Xylose, Galactose und häufig Fucose enthalten. Ein Teil der Xyloglucane ist über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, ein weiterer Teil fest an die Zellulosefibrillen gebunden sowie über Seitenketten in der Zellwandmatrix verankert. Hemizellulosen bilden somit eine Festigungsstruktur, indem sie den Kontakt zwischen den Mikrofibrillen und den anderen Matrixbestandteilen herstellen. Da Xyloglucane länger sind (50-500 nm) als die Zwischenräume zwischen den Zellulosefibrillen (20-40 nm), können sie mehrere solcher Fibrillen miteinander verbinden. Der Anteil an Hemizellulosen in der Primärwand beträgt ebenfalls ca. 25%. Das Herauslösen aus pektinfreien Zellwänden erfolgt normalerweise durch starke Laugen (2-4 M NaOH) (Carpita und McCann, 2000; Mohr et al., 1992; Redgwell und Fischer, 2002; Taiz und Zeiger, 2007).

Pektin

Pektine stellen die gelbildende Komponente der Zellwand-Matrix dar. Es handelt sich dabei um ein Gemisch heterogener, verzweigter und stark hydratisierter Polysaccharide. Sie dienen als Kittsubstanz mit wichtiger Stütz- und Festigungsfunktion. Der Pektinanteil in der Primärwand beträgt ca. 35%, der höchste Gehalt an Pektinen ist allerdings in der Mittellamelle zu finden. Die genaue Zusammensetzung der Pektine kann je nach Pflanzenart, Pflanzenorgan und Alter der Pflanze unterschiedlich sein. Charakteristisch enthalten Pektine saure Zucker, wie z. B. Galacturonsäure, sowie neutrale Zucker, wie Rhamnose, Galactose oder Arabinose (Carpita und McCann, 2000; Taiz und Zeiger, 2007).

Das Pektinmolekül besteht aus verschiedenen Abschnitten:

- Der als **Homogalacturonan (HGA)** oder auch Polygalacturonsäure bezeichnete Abschnitt besitzt eine relativ einfache, unverzweigte Struktur aus (1,4) verknüpften α -D-Galacturonsäure-Bausteinen. Die Carboxylreste sind dabei häufig methylverestert. Aufgrund seiner unverzweigten Struktur wird dieser Abschnitt auch als "smooth region" bezeichnet.
- Ein weiteres pektisches Polysaccharid ist **Rhamnogalacturonan I (RG I)**. Das Rückgrat besteht dabei alternierend aus (1-4)- verknüpfter α -D-Galacturonsäure und (1,2)- verknüpfter α -D-Rhamnose. Das RG I- Molekül trägt Seitenketten aus Arabinanen, Galactanen oder Arabinogalactanen, welche an den Rhamnosebausteinen sitzen. Die Länge der Seitenketten kann stark variieren. Die Galacturonsäure-Bausteine in der Hauptkette sind methylverestert. Die RG I- Seitenketten können laut Popper und Fry (2005) kovalent an Xyloglucan gebunden sein sowie feste Verbindungen mit der Zellulose eingehen (Redgwell, et al., 1997), möglicherweise durch eine Quervernetzung der Zellulosefibrillen oder durch Verzahnung der Xyloglucan-Zellulose und Pektin-Netzwerke miteinander (Vincken et al., 2003; Zykwinska et al., 2005).
- Ein deutlich stärker verzweigtes Polysaccharid ist **Rhamnogalacturonan II (RG II)**, welches ein HGA-Gerüst besitzt, an dem mindestens zehn verschiedene, in komplizierten Verknüpfungsmustern verbundene Zucker sitzen. RG I und RG II sind in ihrer Struktur sehr unterschiedlich. RG II- Einheiten sind in der Zellwand durch Boratdiester quervernetzt (Ishii et al., 1999). Nach Ryden et al. (2003) sowie O'Neill et al. (2004) führt eine fehlende RG II- Quervernetzung durch Bor zum Anschwellen der Zellwand, zunehmender Wandporosität sowie letztlich zu einer mechanischen Schwächung der Zellwand. Dies erklärt vermutlich auch an Früchten auftretende Verkrüppelungserscheinungen bei Bohrmangel. Die verzweigten Bereiche des Pektinmoleküls werden aufgrund ihrer Struktur auch als „hairy regions“ bezeichnet.

Man nimmt an, dass die beschriebenen pektischen Polysaccharide in der Zellwand kovalent aneinander gebunden vorliegen, wobei die genaue Struktur noch unklar ist. Abbildung 5 zeigt zwei mögliche Pektinmodelle. Modell A beschreibt die herkömmliche (traditionelle)

Pektinstruktur, in der sich HGA und RG I- Abschnitte alternierend abwechseln. RG I kann zusammen mit anderen pektischen Polymeren hochverzweigte Strukturen bilden. In Modell B wird das Rückgrat ausschließlich durch RG I gebildet. HGA bildet dabei zusammen mit den anderen Polysacchariden die Seitenketten des Moleküls (Carpita und Gibeaut, 1993; Carpita und McCann, 2000; Redgwell und Fischer, 2002; Taiz und Zeiger, 2007).

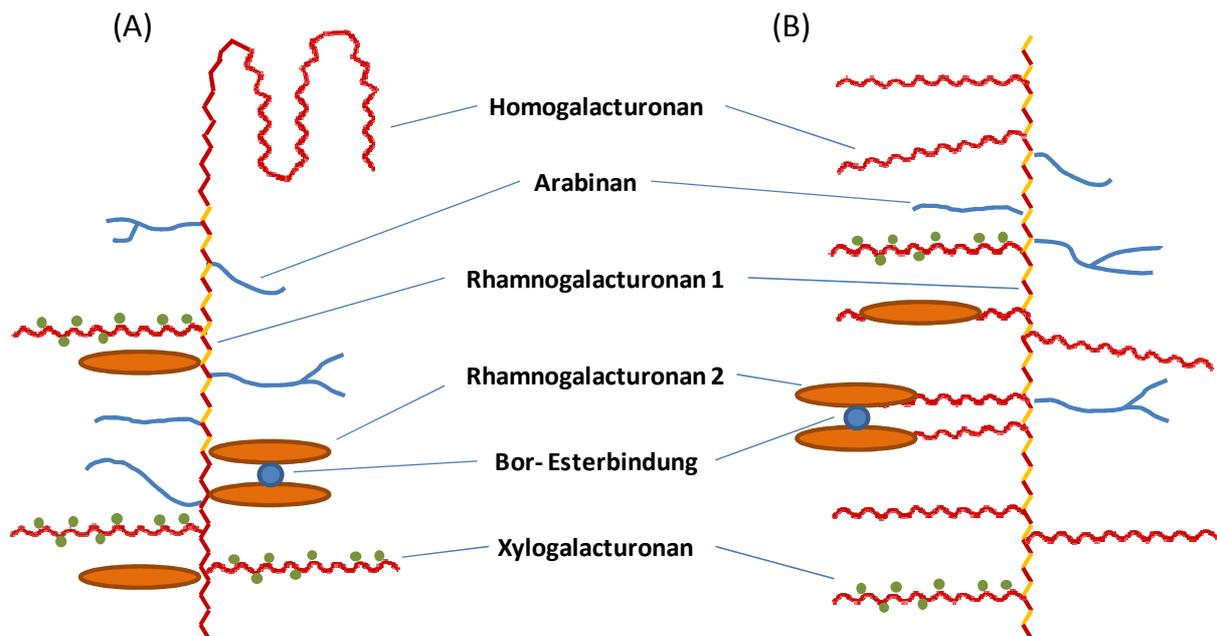


Abbildung 5: Pektinmodelle nach Vincken et al. (2003): (A) traditionelles Modell: Gerüst aus alternierenden HGA und RG I- Abschnitten; RG I kann mit anderen Polysacchariden stark verzweigt sein. In Model (B) besteht das Gerüst aus RGI, alle anderen Polysaccharide bilden die Seitenketten.

Wie bereits erwähnt, besitzen Pektine gelbildende Eigenschaften. Durch ionische Quervernetzung der Carboxylgruppen mittels Ca^{2+} -Brücken kommt es zu einer Vernetzung benachbarter Pektinketten und somit zur Bildung unlöslicher Gele. Die Verbindung solcher Pektinketten mittels Ca^{2+} -Brücken wird auch als "egg-box" bezeichnet (siehe Abb. 6).

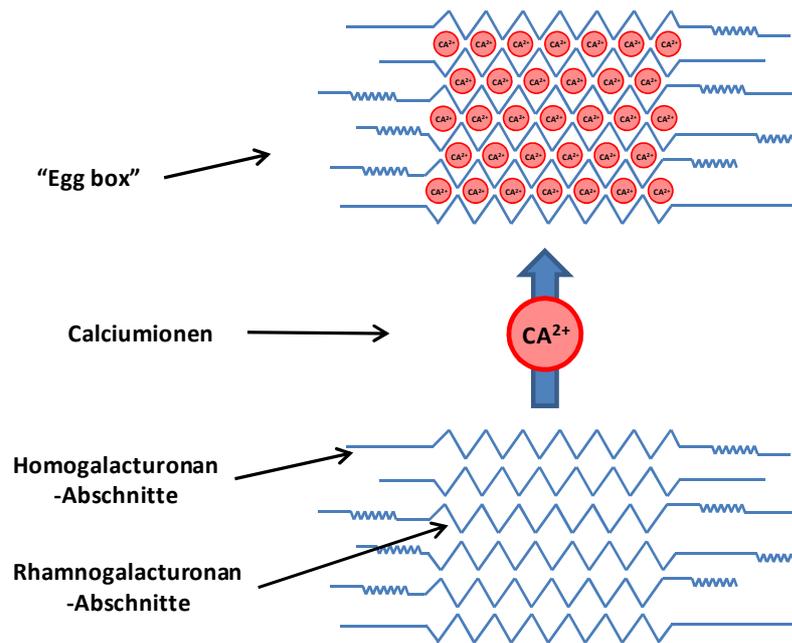


Abbildung 6: Schematische Darstellung mittels Ca^{2+} -Brücken vernetzter Pektinketten ("egg-box") (verändert nach Cabrera et al., 2008).

Viele der sauren Reste können während der Biosynthese im Golgi-Apparat mit Methyl-, Acethyl- oder mit anderen Gruppen verestert werden. Durch diese Methylierungen werden die freien Carboxylgruppen blockiert, wodurch die Bildung von Ca-Brücken verhindert und damit die Fähigkeit der Pektine Gele zu bilden reduziert wird. Sobald die synthetisierten Pektine in die Zellwand abgesondert werden, können mit Hilfe bestimmter Enzyme, sogenannter Methylesterasen, diese Ester gespalten werden (siehe Kapitel 2.4.3.4). Die Fähigkeit der Pektine Gele zu bilden nimmt wieder zu. Das Herauslösen der Ca-Ionen kann durch Oxalsäure (Bildung von Ca-Oxalat) oder durch EDTA (Ethyldiamintetraacetat) erfolgen. Ein weiterer Effekt dieser Esterspaltung ist das Erhöhen der elektrischen Ladungsdichte innerhalb der Zellwand, wodurch die Aktivität von Zellwand-Enzymen beeinflusst werden kann (Taiz und, Zeiger, 2007). Zusätzlich zu den Ca-Brücken können Pektine durch verschiedene kovalente Bindungen, z. B. Ester-Bindungen zwischen phenolischen Bausteinen (z. B. Ferulasäure), miteinander vernetzt werden. (Friedrich et al., 1978; Strassburger et al., 1978; Mohr und Schopfer, 1992; Taiz und Zeiger, 2007).

Strukturproteine

Die Strukturproteine, auch Glykoproteine, stellen in der Primärwand einen Anteil von ca. 5% dar. Das bedeutendste Glykoprotein der Primärwand ist das Extensin. Es besteht zu ca. 50% aus Protein sowie zu ca. 50% aus Kohlenhydraten. Es handelt sich dabei um ein basisches, Hydroxyprolin reiches Glycoprotein (HRGP), in dem zahlreiche Seitenketten an Serin und Hydroxyprolin gebunden sind. Die Seitenketten bestehen vor allem aus Arabinosylresten (an Hydroxyprolin) sowie Galactosylresten (an Serin). Extensin dient der Stabilisierung der Zellwand durch Verbindung mit den Pektinen. HRGPs können in der Zellwand teilweise über kovalente Bindungen zu einem Netzwerk verknüpft sein.

Neben HRGP enthalten die Primärwände des Weiteren ein saures, Arabinogalactan reiches Glykoprotein (AGP). AGPs besitzen ein Gerüst aus kurzen Polypeptidketten (β -1,3-D-Galactose), an dessen Aminosäureresten über glykosidische Bindungen verschiedene Seitenketten sitzen. Hauptbestandteil der Seitenketten sind Galaktose und Arabinose sowie Uronsäure und andere Zucker. AGPs sind wasserlöslich und leicht quellbar. Der Kohlenhydratanteil in den AGPs beträgt laut Gaspar et al. (2001) mehr als 90%. AGPs spielen unter anderem eine Rolle für die Adhäsion der Zellen sowie für die zellulären Signalwege während der Zellteilung (Mohr et al., 1992; Carpita und McCann, 2000).

2.4.2 Zellwandveränderungen während des Weichwerdens der Frucht

Das Weichwerden von Früchten während der Reife ist vor allem auf den Abbau der Zellwandstruktur, aber auch auf eine Reduzierung des Zellurgors zurückzuführen (Shackel et al., 1991). Zellwandveränderungen während der Reife führen zur Schwächung der Primärwand, zu einem teilweisen Anschwellen der Zellwände bei den meisten Obstarten (Redgwell et al., 1997) sowie zu einer schrittweisen Schwächung der Mittellamelle, welche vor allem für den Zusammenhalt benachbarter Zellen verantwortlich ist (Jarvis et al., 2003). Die genannten Veränderungen sind vor allem auf den Abbau von Zellwand-Polysacchariden sowie auf den Verlust der polymeren Netzwerkstruktur der Zellwand zurückzuführen. Nach Gross und Sams (1984) erfolgt zu Beginn der Reife ein Verlust von Galactanen und

Arabinanen aus der Zellwand. Der Abbau der Arabinan-Seitenketten aus RGI kann zum Teil bereits vor beginnendem Festigkeitsverlust beobachtet werden (Brummel et al., 2004; Peña und Carpita, 2004). Man geht davon aus, dass das Pektin-Netzwerk die Porosität der Zellwand bestimmt (Baron-Epel et al., 1988) und somit ein Abbau der entsprechenden RGI-Seitenketten die Diffusion von Enzymen innerhalb des Apoplasten erhöht (Brummel et al., 2006). Untersuchungen nach de Veau et al. (1993) weisen ebenfalls auf eine Bedeutung des Verlustes neutraler Zucker der pektischen Polysaccharide für die physikochemischen Eigenschaften der Zellwand hin: Pektine aus Avocado-Früchten, welche β -Galactosidase-Aktivität ausgesetzt wurden, zeigten eine offensichtliche Beeinträchtigung der molekularen Aggregation, wodurch die Löslichkeit des Pektins zunahm und das Molekulargewicht sichtbar geringer wurde.

Ein weiterer, für den Festigkeitsverlust bedeutender Schritt ist die Spaltung der Methylester Gruppen an Homogalacturonan mit Hilfe von Pektinmethylesterasen. Durch die Esterspaltung entstehen freie, geladene Carboxylgruppen, welche ionische Bindungen mit Ca^{2+} eingehen können. Mit Hilfe dieser Ca^{2+} -Brücken können sich unveresterte HGA-Abschnitte aneinander binden, was zu einer Versteifung der Zellwand führen kann (Jarvis, 1984). Bei Nicht-Vorhandensein von Ca^{2+} -Ionen kann es durch elektrostatische Abstoßung der unveresterten, negativ geladenen HGA-Abschnitte zu einer Lockerung der Bindung in der Zellwand kommen, wodurch das Lösen von Pektinstrukturen sowie ein Anschwellen der Zellwände gefördert werden kann (Brummel et al., 2006). In Untersuchungen hat die Anwendung von Chelatoren wie CDTA zu einer nahezu vollständigen Trennung der Zellverbindungen geführt (Peña und Carpita, 2004), was darauf schließen lässt, dass die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen in reifen Früchten möglicherweise zum Großteil auf Pektin-Quervernetzungen mittels Ca^{2+} -Brücken zwischen den HGA-Abschnitten in der Mittellamelle zurück zu führen ist.

Des Weiteren wird durch die Methylester-Gruppen die Depolymerisierung des HGA-Gerüsts mit Hilfe der endo-Polygalacturonase (PG) unterbunden. Eine effektive Aktivität der endo-PG erfordert daher zunächst eine, zumindest teilweise Spaltung der Methylester mittels Pektinmethylesterasen (Wakabayashi et al., 2000).

Ein weiterer Prozess, der bereits in frühem Stadium der Fruchtreife beginnt und eng mit dem Verlust an Fruchtfleischfestigkeit in Verbindung steht, ist der Abbau von Hemizellulosen. Eine Abnahme des Molekulargewichtes von Xyloglucanen, dem Hauptbestandteil der Hemizellulosen, konnte bei vielen Fruchtarten nachgewiesen werden. Obwohl Xyloglucan während der Fruchtreife depolymerisiert wird, ist der Abbau der Seitenketten im Vergleich zu denen der pektischen Polysaccharide deutlich geringer. Vor allem an den Stellen, an denen Zellulose-Mikrofibrillen durch Hemizellulosen verbunden sind, kann die Hydrolyse von Xyloglucanen Einfluss auf die Integrität der Zellwand haben (Knee et al., 2002). Der Abbau des Hemizellulose-Zellulose Netzwerkes mittels Expansin sowie die Depolymerisierung von Hemizellulosen mittels Hydrolasen oder Transglycosylasen kann von großer Bedeutung für das Anschwellen der Zellwände sein und die Verfügbarkeit von Substraten der Depolymerasen später während der Reife verbessern (Brummel et al., 2006).

Die Solubilisierung von Pektinen nimmt während der Fruchtreife zu, wobei der Abbau pektischer Polyuronide überwiegend in einem späteren Stadium der Reife erfolgt und in der Regel deutlich mit dem Verlust an Festigkeit korreliert. Untersuchungen zeigten, dass bei Früchten mit knackiger Textur, wie z. B. bei Äpfeln, der Abbau der Polyuronide im Vergleich zu Früchten mit weicheren Textureigenschaften deutlich geringer ausgeprägt ist (Yoshioka et al., 1992; Harpster et al., 2002).

Der Abbau des Homogalacturonans, welches als Pektinbestandteil eine der Hauptkomponenten der Mittellamelle darstellt, führt zu einer Schwächung des Kontaktes benachbarter Zellen. Dieser Abbau der interzellulären Adhäsion trägt maßgeblich zu Texturveränderungen während der Fruchtreife bei. Zellulose-Mikrofibrillen scheinen bei den meisten Obstarten nicht abgebaut zu werden (McLachlan und Brady, 1994).

Nach Goulao und Oliveira (2008) kann die Bedeutung bzw. das Vorhandensein einzelner am Zellwandabbau beteiligter Prozesse je nach Fruchtart unterschiedlich sein. Veränderungen der Pektinstrukturen können z.B. sowohl durch Depolymerisation als auch durch Solubilisierung der Pektine erfolgen. Während die Solubilisierung von Pektinen in den meisten Fruchtarten vorzukommen scheint, spielt die Depolymerisation nur bei manchen eine Rolle. Bei Tomaten ist das Weichwerden der Frucht sowohl mit einer Depolymerisation

sowie Solubilisierung der pektischen Polyuronide (Huber und O'Donoghue, 1993; Brummel und Labavitch, 1997) sowie der Depolymerisation von Hemizellulosen (MacLachlan und Brady, 1994; Brummel et al., 1999a) verbunden, während bei Äpfeln die Depolymerisation von Pektinen (Yoshioka et al., 1992) sowie Hemizellulosen (Percy et al., 1997; Siddiqui et al., 1996) keine Rolle zu spielen scheint. Zusammen mit der Solubilisierung von Pektinen ist der Verlust an neutralen Zuckern, wie Galactose, Arabinose und Xylose, von den Seitenketten des Pektinmoleküls ein Prozess, der bei allen Fruchtarten, jedoch mit gewissen Unterschieden, auftritt. Nach Seymour et al. (1990) und Redgwell et al. (1992) scheint sich die Solubilisierung von Pektinen durch den Zerfall der zusammenhängenden Pektin-Matrix zu ereignen, welche durch den Schwund an Galactosylresten oder anderen neutralen Zuckern aus den Seitenketten des verzweigten Rhamnogalacturonans verursacht wird. Diese Veränderungen führen offenbar zum Auflösen der pektinreichen Mittellamelle, somit zu einer Schwächung der Adhäsion benachbarter Zellen und letztlich zu Texturveränderungen der Frucht.

2.4.3. Aktivität zellwandabbauender Enzyme

2.4.3.1 Allgemeiner Überblick

Strukturelle Veränderungen der Zellwände während der Fruchtreife erfolgen sowohl in den Pektinen als auch in den Hemizellulose- und Zellulose- Fraktionen (Huber, 1983; Seymour et al., 1990). Veränderungen der Polysaccharid-Strukturen der Zellwand werden auf die Aktivität einer Reihe zellwandabbauender Enzyme zurückgeführt (Siddiqui et al., 2004; Brummel, 2006; Nikolic´ und Mojovic, 2006; Ortiz und Lara, 2008). Viele Studien zur Fruchtreife und zur Bedeutung zellwandabbauender Enzyme wurden an Tomaten, als Modell einer klimakterischen Frucht, sowie an Erdbeeren, als Modell einer nicht-klimakterischen Frucht, durchgeführt, Erkenntnisse zu anderen Fruchtarten sind jedoch teilweise noch unvollständig und mangelhaft. Bisherige Studien an verschiedenen Früchten zeigen jedoch, dass es in der Bedeutung einzelner Enzyme für die Reife bzw. das Weichwerden einer Frucht deutliche Unterschiede zwischen Arten und sogar Sorten gibt (Goulao und Oliveira, 2008).

Nach Wei et al. (2010) wurde bisher noch wenig untersucht, wie Genexpression und Aktivität der entsprechenden Enzyme mit Veränderungen der Textureigenschaften einer Frucht in Zusammenhang stehen.

Die einzelnen enzymkatalysierten Veränderung der Zellwandstruktur beinhalten nach Brummel et al. (2006) folgende Prozesse:

- Abspaltung polymerer oder monomerer Zucker-Seitenketten
- Abspaltung von Methylestern oder Acetylgruppen aus den unverzweigten Homogalacturonan-Abschnitten des Pektins
- Spaltung der polymeren Rückgrat-Gerüststrukturen
- Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulose-Mikrofibrillen und Hemizellulosen

Die Funktion zellwandabbauender Enzyme wird im folgenden Überblick kurz beschrieben (Pharr et al., 1976; Rexova-Benkova und Markovic, 1976; Dominguez und Puigjaner et al., 1997; Medina-Escobar et al., 1997; Bewley et al., 2000; Brummel und Harpster, 2001; Chen und Paull, 2003; Itai et al., 2003; Schröder et al., 2004):

- Endo-Polygalacturonase (endo-PG): hydrolytische Spaltung des Homogalacturonan (HGA)-Rückgrates im Pektinmolekül
- Exo-Polygalacturonase (exo-PG): schrittweise Abspaltung der Galacturonsäurereste aus dem HGA-Gerüst
- Pectatlyase (PL): Spaltung des HGA-Rückgrates durch β -Eliminierung
- Pektinmethylesterase (PME): Spaltung der Methylestergruppen an den HGA-Abschnitten, wodurch geladene Carboxylsäure-Gruppen entstehen und Methanol frei wird.
- β -Galactosidase (β -Gal): abspalten der Galactanseitenketten aus den Rhamnogalacturonan I (RG I)-Abschnitten des Pektinmoleküls

- α -L-Arabinofuranosidase: Abspalten der Arabinan-Seitenketten an RG I
- β -D-Endoglucanase: hydrolytische Spaltung der 1,4- β -D-Glucanketten im Inneren der Zellulose
- Xyloglucan-endotransglycosylase (XET): Spaltung des Glucan-Gerüsts im Xyloglucan und Bindung an ein anderes Xyloglucan-Molekül
- β -Xylosidase (β -Xyl): Hydrolyse der β -1,4-D-Xylopyranosyl Verbindungen am Xylan, wobei β -D-Xylose vom nicht reduzierenden Ende frei wird
- Expansin: Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulose-Mikrofibrillen und Hemizellulosen

Man geht davon aus, dass nicht einzelne Enzymgruppen für den Abbau der Zellwand verantwortlich sind, sondern dass vor allem das synergistische Zusammenspiel verschiedener Enzyme zum Weichwerden der Frucht führt, wobei die Aktivitäten der Enzyme in Interaktion zueinander stehen können (Rose und Bennett, 1999). Nach Seymour und Manning (2002) konnten die größten Fortschritte bei der Erforschung der Rolle einzelner Enzyme in den vergangenen Jahren mit Hilfe von transgenen Pflanzen zur Überprüfung von Hypothesen zur Rolle einzelner, zellwandabbauender Enzyme erreicht werden (siehe Kapitel 3.4.3.2 bis 3.4.3.10).

Zellwandabbauende Enzyme werden, entsprechend der Polysaccharide, welche ihnen als Substrat dienen, eingeteilt in pektolytische Enzyme (Pektinasen) sowie nicht pektolytische Enzyme. Zu den Pektinasen zählen endo- sowie exo-Polygalacturonasen (endo-EC3.2.1.15; exo-EC3.2.1.67), Pectatlyasen (EC 4.2.2.2), Pektinmethylesterasen (EC 3.1.1.11), β -Galactosidasen (EC 3.2.1.23) sowie α -L-Arabinofuranosidasen (EC 3.2.1.55). Diese Enzyme sind in der Lage, die Spaltung oder Veränderung des Polysaccharid-Rückgrates oder die Abspaltung neutraler Zucker an den verzweigten Seitenketten im Pektinmolekül zu katalysieren. Nicht pektolytische Enzyme hingegen katalysieren Veränderungen der Hemizellulosen bzw. die Spaltung der Bindungen zwischen Hemizellulosen und

Zellulosefibrillen. Zu dieser Klasse der Enzyme zählen unter anderem 1,4- β -D-Endoglucanasen (EC 3.2.1.4), endo-1,4- β -Xyloglucan-Endotransglycosylasen (E.C. 2.4.1.207), β -Xylosidasen (EC 3.2.1.37) sowie Expansine (Itai et al., 2003; Goulao und Oliveira, 2008), wobei Expansine eigentlich nicht zur Klasse der Enzyme zählen (Redgwell und Fischer, 2002).

2.4.3.2 Polygalacturonase (PG; endo-EC 3.2.1.15; exo-EC 3.2.1.67)

Nach Seymour und Manning (2002) handelt es sich bei der Polygalacturonase um das wohl am meisten untersuchte, zellwandabbauende Enzym. Polygalacturonasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse der α -1,4-D-glykosidischen Bindungen zwischen den Galacturonsäurebausteinen im Pektinmolekül katalysieren. Man unterscheidet dabei zwischen endo- sowie exo-Polygalacturonasen. Exo-Polygalacturonasen katalysieren die schrittweise Abspaltung einzelner Galacturonsäurereste vom nicht reduzierenden Ende des HGA-Gerüsts aus, wogegen endo-Polygalacturonasen die hydrolytische Spaltung im Inneren des HGA-Rückgrates katalysieren (Brummell und Harpster, 2001). In der Regel bezieht sich die reifebezogene Bezeichnung Polygalacturonase auf den endo-Typ, wobei beide Typen in Früchten vorkommen (Hadfield und Bennett, 1998).

Die Zunahme der PG-Aktivität während der Fruchtreife korreliert nach Redgwell und Fischer (2002) deutlich mit Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit, wobei die Größenordnung an messbarer PG-Aktivität je nach Pflanzen- bzw. Fruchtart sehr unterschiedlich sein kann (Hobson, 1962). Nach Redgwell und Fischer (2002) ist in Tomaten wie auch in Kiwifrüchten eine intensive Depolymerisation des Pektins mit hoher endo-PG-Aktivität verbunden. In zahlreichen Früchten, in denen hingegen endo-PG Aktivität nur auf sehr geringem Level gemessen werden kann, wie z.B. an Äpfeln (Wu et al, 1993), erfolgt eine nur geringfügige Depolymerisation des Pektins. Über das Vorhandensein von endo-PG in Äpfeln lassen sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen finden. Bartley und Knee (1982), Abeles und Biles (1991) sowie Goulao et al. (2007) konnten in Untersuchungen an Äpfeln keine messbaren Mengen an endo-PG finden. Liang et al. (1982) und Kramer et al. (1992) hingegen wiesen endo-PG Aktivität in Äpfeln nach.

Ein Großteil an Untersuchungen zur Rolle der Polygalacturonasen wurde an Tomaten als Modellfrucht durchgeführt. Während der Tomatenreife nimmt die Aktivität der endo-PG verbunden mit einer ständigen *de novo* Synthese des Enzyms deutlich zu (DellaPenna et al. 1986). Nach Tucker et al. (1980) finden sich in Tomaten zwei Isoformen der endo-PG, PG1, welche sehr früh während der Fruchtreife akkumuliert wird, und PG2 welche als Haupt-Isoform in reifen Tomatenfrüchten auftritt. Redgwell und Fischer (2002) weisen darauf hin, dass die Depolymerisation des Pektins zu einem späteren Stadium des Weichwerdens zu erfolgen scheint, wenn das Substrat (gelöstes Pektin) für die Polygalacturonase leicht verfügbar ist. Nach Daas et al. (2000) benötigen Polygalacturonasen zur Initialisierung sowie zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität verschiedene Galacturonosyl-Reste in der freien Säureform. Pektine, welche methylveresterte oder acetylierte Galacturonosyl-Reste besitzen, sind nach Redgwell und Fischer (2002) ungünstige Substrate für die endo-Polygalacturonase. Nach Jarvis (1984) muss bei methylveresterten HGA-Abschnitten zunächst eine Spaltung der Methylester erfolgen, um das Substrat verfügbar für Polygalacturonasen zu machen. Dies weist vor allem auch auf die Bedeutung der Pektinmethylesterase für die Substratverfügbarkeit der Polygalacturonase hin.

Versuche mit transgenen Pflanzen konnten zeigen, dass Polygalacturonasen zwar eine wichtige Rolle beim Pektinabbau sowie teilweise bei der Solubilisierung von Pektinen spielen, dass sie jedoch nur eine unter vielen, am Weichwerden einer Frucht beteiligten Komponenten darstellen. So war in Untersuchungen von Sheehy et al. (1988) sowie Smith et al. (1988) nach Unterdrückung der PG-Genexpression in Tomaten zwar eine deutliche Reduzierung an PG mRNA zu beobachten, jedoch hatte dies keinen Einfluss auf das Weichwerden der Früchte. In einer entsprechenden Studie hatte eine Hochregulierung eines PG Transgens in einer "non softening" Mutante bei Tomaten ebenfalls keinen Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit (Giovannoni et al., 1989). Hinweise auf eine endo-PG unabhängige Solubilisierung des Pektins in Äpfeln konnte Knee (1978) liefern. In den Untersuchungen erfolgte trotz nicht vorhandener endo-PG Aktivität ein Abbau der Zellwand während der Fruchtreife. Auch wenn die Aktivität der endo-PG für die Solubilisierung der Zellwand von Bedeutung ist, besteht nach Redgwell et al. (1997b) kein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Pektin-Solubilisierung und dem Aktivitätslevel der endo-PG.

In Untersuchungen von Carrington et al. (1993) mit transgenen Tomaten zeigten Früchte mit unterdrückter PG-Aktivität nach Zellwandfraktionierung einen reduzierten Anteil H₂O-löslicher Pektine sowie gleichzeitig eine Zunahme an Na₂CO₃-löslichen (kovalent gebundenen) Polyuroniden. Sie schlossen daraus, dass Polygalacturonasen vor allem bei der Depolymerisation kovalent gebundener Pektine sowie deren Solubilisierung in die H₂O-lösliche Fraktion agieren. Brummel und Labavitch (1997) konnten hingegen mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie an antisense-PG Früchten im Vergleich zu Kontrollfrüchten eine leicht verzögerte Depolymerisation CDTA löslicher (ionisch gebundener) Pektine in reifen und überreifen Früchten, einen reduzierten Anteil an Na₂CO₃-löslicher, kovalent gebundener Zellwandfraktion in überreifen Früchten und einen daraus resultierenden höheren Anteil an größeren Molekülen sowie geringeren Anteil an Molekülen geringer und mittlerer Größe nachweisen. Auch Shelf-life verbessernde Eigenschaften der Früchte, geringere Anfälligkeit für Platzen und mechanische Beschädigungen sowie eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Pathogene konnten in verschiedenen Untersuchungen an antisense-Tomaten beobachtet werden (Schuch et al., 1991; Kramer et al., 1992; Langley et al., 1994).

Nach Sitrit und Bennett (1998) wird die Anreicherung von PG mRNA durch Ethylen reguliert und nimmt mit zunehmender Dauer des Ethyleneinflusses zu, wobei bereits geringe Mengen an Ethylen für eine Induzierung ausreichen. Diese Tatsache konnten auch Untersuchungen an Äpfeln von Wakasa et al. (2006) bestätigen. Dabei wurde in einem Vergleich an 14 verschiedenen Apfelsorten festgestellt, dass alle untersuchten Sorten mit sehr gutem Erhalt der Festigkeit, wie z.B. `Fuji`, eine sehr schwache oder schwankende Expression des für PG kodierenden Md-PG1 Gens aufwiesen, dies jedoch unabhängig von der Ethylenproduktionsrate der jeweiligen Sorte war. An Früchten, welche mit 1-MCP behandelt wurden, konnte dabei kein Hybridisierungssignal von Md-PG1 sowie weiteren untersuchten Genen und eine nur geringe Ethylenproduktion gemessen werden.

Während nach Kertesz (1951), Pilnik und Voragen (1970), Bartley (1978) sowie Abeles und Biles (1991) in Äpfeln ausschließlich exo-Polygalacturonasen eine Rolle spielen, ergaben Studien von Wu et al. (1993), dass es sich, im Gegensatz zu früheren Beobachtungen, beim

Apfel vor allem um endo-Polygalacturonasen handelt. Nach Wu et al. (1993) beruhen frühere Ergebnisse, wonach in Äpfeln keine endo-PG-Aktivität zu finden ist, vor allem auf der Tatsache, dass der Proteingehalt im Apfelpewebe ca. 50- bis 100-fach niedriger ist als in Tomaten, woraus eine, bezogen auf das Frischgewicht, deutlich geringere PG-Aktivität resultiert. Wu et al. (1993) konnten an Früchten der Apfelsorte `McIntosh`, an denen er zuvor PG-Aktivität nachgewiesen hatte, in Immunoblots mit Hilfe von "anti-tomato-PG Antikörpern" Proteinbanden identifizieren, welche sich anhand der Molekularmasse endo-PG-Banden zuordnen ließen, welche in früheren Versuchen von Ali und Brady (1982) sowie Della Penna et al. (1990) an Tomaten beschrieben worden waren. Zusätzlich konnten Wu et al. (1993) mittels Viskositätstests an aufgereinigtem PG-Probenmaterial aus Äpfeln eine schnelle Abnahme der Viskosität der Proben in den ersten beiden Stunden der Inkubation, einen relativ langsamen Anstieg an reduzierenden Gruppen sowie das Fehlen monomerer Galacturonsäure während der gesamten Reaktionszeit beobachten. Somit konnten sie zeigen, dass es sich bei der in `McIntosh` nachgewiesenen Polygalacturonase um eine endo-agierende Form des Enzyms handelt. Dem gegenüber stehen aktuellere Ergebnisse von Goulao et al. (2007), wonach in Äpfeln der Sorte `Gala` ausschließlich exo-, jedoch keine endo-Polygalacturonase-Aktivität gemessen werden konnte. Nach Goulao et al. (2008) sind diese teilweise gegensätzlichen Resultate bezüglich der Bedeutung von endo-PG noch weitestgehend aufzuklären, können jedoch vermutlich auf methodische Differenzen bzw. Unterschiede zwischen den einzelnen Sorten zurückgeführt werden.

2.4.3.3 Pektatlyase (PL; EC 4.2.2.2)

Pektatlyasen katalysieren die Spaltung der Polygalacturonsäuren im Pektin-Hauptgerüst mittels β -Eliminierung. Nach Payasi und Sanwal (2003) gibt es bisher nur wenig Klarheit über die Aktivität der Pektatlyase in der Zellwand sowie nur wenige Berichte über deren Rolle während der Fruchtreife. Untersuchungen konnten eine Akkumulation von vermeintlicher PL-mRNA in reifenden Erdbeeren (Medina-Escobar et al., 1997) sowie Bananen (Dominguez-Puigjaner et al., 1997; Medina-Suarez et al., 1997; Marin Rodriguez et al., 2003) beschreiben. In Versuchen von Jimenez-Bermudez et al. (2002) zeigten Erdbeeren mit unterdrückter PL- mRNA-Expression signifikant höhere Fruchtfleischfestigkeit als die Kontrollfrüchte. Im

Gegensatz zu Payasi et al. (2004), der in präklimakterischen Bananenfrüchten keine PL-Aktivität nachweisen konnte, stellte Goulao et al. (2007) in Untersuchungen an `Gala` Äpfeln die höchste Enzymaktivität zum Zeitpunkt des Fruchtansatzes fest, konnte jedoch auch während der Fruchtreife sowie Alterung PL-Aktivität messen, was auf eine mögliche Rolle des Enzyms für das Weichwerden von Äpfeln hinweist. Auch wenn man davon ausgeht, dass in Äpfeln keine Depolymerisation des Pektins erfolgt, könnte die Pektatlyase wichtige Zellwandveränderungen bewirken (Goulao et al., 2007). Trainotti et al. (2003) untersuchte an Pfirsichen (`Red Haven`) zu verschiedenen Tagen (d) nach der Vollblüte (40 d, 65 d, 85 d, 95 d, 115 d, 120-125 d) die Genexpression einer Reihe zellwandabbauender Enzyme. Die Expression der beiden für die Pektatlyase kodierenden Gene, Ctg251 und Ctg257, stieg ca. 90 Tage nach der Vollblüte deutlich an, erreichte maximale Expressionslevels 115 Tage nach der Vollblüte und nahm anschließend nach dem klimakterischen Ethylenanstieg drastisch ab. Die Expression der restlichen pektolytischen Enzyme, Polygalacturonase, β -Galactosidase und Pektinmethylesterase setzte hingegen mit Beginn des klimakterischen Ethylenanstiegs ein und stieg anschließend bis 125 Tage nach der Vollblüte weiter an. Trainotti et al. (2003) schlossen daraus, dass Pektatlyasen womöglich in relativ frühem Stadium zum Abbau der Pektine beitragen und dadurch die pektolytische Wirkung weiterer Enzyme ermöglichen bzw. erleichtern.

Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kam Goulao et al. (2008) in Untersuchungen an Äpfeln der Sorte `Gala`. Dabei wurden die höchsten Expressionswerte von Md-PL1, einem für die PL-Aktivität kodierenden Gen, vor allem in der Periode vom Fruchtansatz bis zum Ende der Zellstreckung gemessen. Zur Ernte war eine nur sehr geringe Expression bzw. nach der Ernte keine Genexpression festzustellen, was darauf hindeutet, dass die Rolle der PL für das Weichwerden von Äpfeln, falls vorhanden, vor allem zu Beginn des Festigkeitsverlustes von Bedeutung ist (Goulao et al., 2008). Im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen an Äpfeln konnten Ortiz et al. (2011) in Versuchen mit `Golden Delicious` Äpfeln während 14 Tagen Shelf-Life bei 20°C im Anschluss an 19 und 31 Wochen Kühl- bzw. CA-Lagerung bei 1°C einen Anstieg der PL-Aktivität feststellen. Eine PLSR (Partial least squares regression)-Analyse ergab dabei einen deutlichen Zusammenhang zwischen PL-Aktivität und Solubilisierung des Zellwandmaterials bzw. eine negative Korrelation zur Veränderung der

Fruchtfleischfestigkeit. An unter ULO-Bedingungen (1 kPa O₂; 2 kPa CO₂) gelagerten Früchten konnte dabei eine geringere PL-Aktivität gemessen werden als an Äpfeln aus dem Kühllager. Ca-Tauchbehandlungen mit 2% CaCl₂ hatten in den Untersuchungen von Ortiz et al. (2011) ebenfalls eine geringere PL-Aktivität sowie einen verbesserten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfrüchten zur Folge.

2.4.3.4 Pektinmethylesterase (PME; EC 3.1.1.11)

Pektinmethylesterasen katalysieren die Hydrolyse der Esterbindung zwischen Methanol und der Carboxylfunktion der Galacturonsäurebausteine im Pektinmolekül. Dabei entstehen sowohl freie Carboxylgruppen als auch freies Methanol (Benen et al., 2002). Durch diese Demethylierung des Pektins kommt es zu pH- Wert- und Ladungs-Änderungen in der Zellwand, zu Ca²⁺-Quervernetzungen der Pektine an den freien Carboxylgruppen und dadurch zur Bildung sogenannter "egg-box"-Strukturen, was zu einer Festigung der Zellwand führen kann (Phan et al., 2007). Zudem ermöglicht dies die Verfügbarkeit der Polyuronide für enzymatischen Abbau durch Polygalacturonasen (Pressey und Avants, 1982; Jarvis, 1984; Seymour et al., 1987; Koch und Nevins, 1989; Carpita und Gibeaut, 1993).

Untersuchungen zur Enzymaktivität der PME an Tomaten ergaben, evtl. Sorten- oder Methoden-bedingt (Goulao et al. 2008), teilweise gegensätzliche Ergebnisse. Während Gaffe et al. (1994) an der Sorte `Rutgers` einen Anstieg der PME-Aktivität während des grünen Stadiums der Frucht mit anschließender Abnahme der Aktivität beobachteten, berichten Tucker et al. (1982) an `Ailsa Craig` über einen Anstieg der Aktivität während der Fruchtreife. Harriman et al. (1991) konnten ebenfalls an `Rutgers` eine Zunahme der PME-Aktivität bei Tomaten während der Phase des Farbumschlags beobachten, anschließend nahm diese ab. Ebenfalls an Tomaten wurden verschiedene Isoenzyme der PME nachgewiesen (Pressey und Avants, 1972; Delincee, 1976; Tucker et al., 1982). Tucker et al. (1982) konnten zum Beispiel an `Ailsa Craig` zwei verschiedene Isoenzyme, PME1 und PME2, identifizieren. Während PME1 im Zuge der Fruchtreife leicht abnahm, war bei PME2 ein starker Anstieg der Aktivität zu beobachten.

Um die Rolle der PME für die Fruchtentwicklung und-reife bei der Tomatensorte `Rutgers` zu untersuchen bauten Tieman et al. (1992) jeweils ein PME sense (pTiPMES) sowie ein

antisense (pTiPMEA) Konstrukt mittels *Agrobacterium tumefaciens* in das Genom der Früchte ein. Früchte mit einer hohen Expression an PME antisense RNA zeigten nur 10% der Enzymaktivität des Wildtypes und keine messbaren Mengen an PME Protein sowie mRNA. Die geringere Enzymaktivität in den antisense-Früchten war mit einem höheren Molekulargewicht sowie Veresterungsgrad der Pektine verbunden. Zudem wiesen diese Früchte höhere Gehalte an löslicher Trockensubstanz auf als der Wildtyp. Die Ergebnisse zeigten, dass die Inhibierung der PME-Aktivität an Tomaten deutlichen Einfluss auf den Pektin-Metabolismus hatte, die Reifeprozesse jedoch nicht beeinflusst wurden.

In weiteren Untersuchungen von Tieman und Handa (1994) mit Früchten der vierten Generation der transgenen antisense Tomaten hatten die Unterdrückung der PME-Aktivität und die damit verbundene geringere Depolymerisation des Pektins negativen Einfluss auf das Shelf-life der Früchte. In den Untersuchungen führte die Inhibierung der Pektinmethylesterase-Aktivität zwar zu einer reduzierten Pektin-Depolymerisation, hatte jedoch während der normalen Reifephase keinen Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit. Erst in überreifen Früchten führte die reduzierte PME-Aktivität zum kompletten Verlust der Gewebestabilität (Tieman und Handa, 1994), was vermutlich auf die Verhinderung ionischer Ca-Brückenbindungen zwischen den Pektinen zurückzuführen war. Die Ursache für die geringere Polyuronid-Depolymerisation und die abnehmende Menge an EDTA-löslichem Pektin in den transgenen Tomaten (Tieman et al., 1992) besteht nach Brummel und Harpster (2001) darin, dass der höhere Grad der Methyl-Veresterung die durch Polygalacturonasen katalysierte Hydrolyse des Pektins erschwert. Nach Brummel und Harpster (2008) spielt die Aktivität der PME auf Grund der Bedeutung für den Zusammenhalt benachbarter Zellen mittels ionischer Bindungen vor allem zum späteren Zeitpunkt der Fruchtreife (Shelf-life) eine wichtige Rolle für die Stabilität des Gewebes.

In Äpfeln bleibt der Veresterungsgrad insgesamt während der Reife unverändert (Klein et al., 1995), wobei nach Knee (1978) und Yoshioka et al. (1992) der Grad der Methyl-Veresterung in der Wasser- sowie in der CDTA-löslichen Zellwandfraktion abnimmt, während die entsprechende unlösliche Fraktion diesbezüglich unverändert bleibt. Da die Wasser-löslichen Pektine einen geringeren Methyl-Veresterungsgrad aufweisen als die in EDTA- und HCl-lösliche Zellwandfraktion, scheint die Spaltung der Methylester an den Pektinen eher zu

deren Solubilisierung zu führen als eine Depolymerisation der Polyuronide (Yoshioka et al., 1992). Dies spricht für eine Bedeutung der Pektinmethylesterasen für das Weichwerden von Äpfeln und stützt nach Goulao et al. (2007) die Vermutung, dass endo-Polygalacturonasen beim Apfel keine bzw. eine nur sehr geringe Rolle spielen.

Goulao et al. (2007) konnten an `Gala` Äpfeln zu allen Entwicklungsstadien vom Fruchtansatz bis zur Überreife der Äpfel PME-Aktivität messen, wobei die höchsten Werte während des Fruchtwachstums sowie zur Ernte beobachtet wurden. Nach der Ernte nahm die Aktivität der PME leicht ab. Ein Rückgang nach der Ernte konnte auch bei Birnen (Ahmed und Labavitch, 1980), Tomaten (Gaffe et al., 1994; Tieman und Handa, 1994) sowie Äpfeln (Siddiqui et al., 2004) beobachtet werden. Überraschenderweise konnten Goulao et al. (2008) an `Gala` sowie an `Golden Delicious` in PCR-Analysen selbst nach 40 Amplifikationszyklen keine mRNA-Akkumulation von Md-PME1, einem für PME-Aktivität kodierenden Gen, feststellen. Wei et al. (2010) untersuchten Enzymaktivität sowie Genexpression der Pektinmethylesterase an Äpfeln der Sorte `Golden Delicious` sowie `Fuji`. Dabei konnten sie an beiden Sorten eine negative Korrelation zwischen PME-Aktivität und Fruchtfleischfestigkeit (`Golden Delicious`: $r = -0,982$; `Fuji`: $r = -0,881$) feststellen. Während an `Fuji`, der Sorte mit geringerem Festigkeitsverlust nach der Ernte, die PME-Aktivität zu Beginn der Lagerung nur leicht anstieg, zwischen 14 und 42 Tagen Lagerung konstant blieb und anschließend wieder abnahm, war bei `Golden Delicious` ein permanenter und deutlicher Anstieg der Enzymaktivität messbar. An beiden Sorten wirkte eine Behandlung mit 1-MCP sowie die Lagerung bei niedrigen Temperaturen (0°C) hemmend auf die Aktivität der PME. An `Fuji` stimulierte zudem die Applikation von Ethephon die Aktivität des Enzyms. Die entsprechende Genexpression (Md-PME) nahm bei `Golden Delicious` unmittelbar nach der Ernte deutlich zu, wogegen an `Fuji` erst nach ca. 42 Tagen Lagerung ein Anstieg zu verzeichnen war. Vor allem bei `Golden Delicious` führte 1-MCP zu einer starken Inhibierung der Genexpression.

2.4.3.5 β -Galactosidase (β -Gal; EC 3.2.1.23)

β -Galactosidasen stellen zusammen mit α -Arabinofuranosidasen die wichtigsten Galactosidasen dar (Wei et al., 2010). Eine der deutlichsten Veränderungen in den Zellwänden reifender Früchte ist nach Gross und Sams (1984) der Abbau von Galactose-Resten aus den Zellwand-Polymeren. Bis zu 70% der in der Zellwand befindlichen Galactose wird während der Fruchtreife durch Abspaltung von den Galaktan-Seitenketten entfernt (Redgwell et al., 1997a). Dennoch ist nach diesem Autor noch nicht geklärt, ob der Prozess der Pektin-Solubilisierung sowie der Verlust an Galactose in der Zellwand ursächlich, zufällig oder als Folge für das Weichwerdens der Frucht zu sehen ist.

Ein Großteil der in der Zellwand vorkommenden Galactose befindet sich als Seitenketten gebunden an die Rhamnose-Reste des Rhamnogalacturonan I-Gerüsts (Carpita und Gibeaut, 1993). β -Galactosidasen katalysieren die Hydrolyse von endständigen, nicht reduzierenden β -D-Galactosyl-Resten der β -D-Galactoside (Redgwell und Fischer, 2002). In Äpfeln wurde das Weichwerden der Frucht mit einem Rückgang des Galactosegehaltes in der Zellwand und einem Anstieg an β -Galactosidase-Aktivität in Verbindung gebracht (Bartley, 1974). Ross et al. (1993) konnten an Äpfeln zwar eine relativ geringe *in vitro* Aktivität der β -Galactosidase feststellen, schlossen jedoch daraus, dass bereits geringe *in vivo* Aktivität des Enzyms erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit der Pektine haben kann, indem die Fähigkeit der Pektine sich aneinander zu binden reduziert wird (De Veau et al., 1993). Eine begrenzte Aktivität der β -Galactosidasen an den Seitenketten des Pektingerüsts kann nach Ross et al. (1994) großen Einfluss auf die Substratverfügbarkeit für die Aktivität anderer, zellwandabbauender Enzyme haben. Nach Lidster et al. (1985) können Behandlungen mit Polyphenolen, welche die Aktivität der β -Galactosidase hemmen (Dick und Bearne, 1988), den Abbau der Fruchtfleischfestigkeit verzögern und das Shelf-life verlängern.

Yoshioka et al. (1995) konnten an reifenden Äpfeln vier verschiedene Isoenzyme der β -Galactosidase identifizieren, wobei nur bei einem, GA-ase I, bei dem die Aktivität während der Lagerung zunahm, eine effektive Abgabe von Galactose aus den pektischen Polysacchariden festgestellt werden konnte. GA-ase II, III, und IV hingegen waren in der

Lage, die Hydrolyse von Arabinogalactan zu katalysieren. Da einzelne Isoenzyme der β -Galactosidase je nach Fruchtart eine unterschiedliche Rolle für Veränderungen im Bereich der Zellwände während der Fruchtentwicklung und –reife spielen, ist es nach Tateishi (2008) notwendig, die Rolle der β -Galactosidasen für das Weichwerden auf genetischer Ebene zu betrachten.

In Untersuchungen von Smith et al. (2002) wurde bei Tomaten durch Einbau einer antisense TBG4 cDNA (TBG4 = eines von mindestens sieben Genen, welche bei Tomaten für die β -Galactosidase kodieren (Smith et al., 1998)) die Aktivität der β -Galactosidase gehemmt. Dies führte zu einer bis zu 40% höheren Fruchtfleischfestigkeit in den Antisense-Früchten. Die entsprechenden Tomaten wiesen außerdem die niedrigsten Gehalte an TBG4 mRNA und an exo-Galactanase sowie den höchsten Galctosylgehalt in der Zellwand während der frühen Reifestadien auf, was Hinweise auf die Bedeutung der β -Galactosidase für Zellwandveränderungen und das Weichwerden der Frucht lieferte.

Wallner (1978) konnte in Untersuchungen mit vier verschiedenen Apfelsorten einen Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität während der Fruchtreife feststellen, wobei die Enzymaktivität in engem Zusammenhang mit dem Festigkeitsverlust der Früchte zu stehen schien. Ein Absenken der Temperaturen führte dabei zu geringeren β -Galactosidase Aktivitäten sowie zu einem geringeren Verlust an Fruchtfleischfestigkeit während der Lagerung. Ein Anstieg der β -Galactosidase Aktivität während der Reife von Äpfeln konnte in weiteren Studien beobachtet werden (Goulao et al., 2007; Ortiz et al. 2011). Ross et al. (1994) konnte an Äpfeln der Sorte `Granny Smith` einen β -Galactosidase cDNA Klon, pABG1, identifizieren. Sie stellten während der Fruchtenwicklung und –reife eine Akkumulation von pABG1-homologer RNA fest. Goulao et al. (2008) untersuchten die Akkumulation von pABG1-homologer RNA an `Gala` Äpfeln. Sie konnten dabei sehr hohe Expressionswerte zur Ernte beobachten sowie einen Erhalt der hohen Expressionslevel während des Weichwerdens der Früchte. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit `Granny Smith` (Ross et al., 1994) war bei `Gala` ein früherer Beginn der Transkription zu erkennen, was nach Goulao et al. (2008) unter Umständen mit dem früheren Weichwerden der Sorte `Gala` im Vergleich zu `Granny Smith` zusammenhängt. Wie schon bei der Pektinmethylesterase beschrieben wurde von Wei et al.

(2010) an zwei Apfelsorten mit sehr unterschiedlichem Festigkeitsabbau während der Lagerung, `Golden Delicious` und `Fuji`, die Aktivität zellwandabbauender Enzyme sowie die Expression der entsprechenden Gene untersucht. `Golden Delicious` zeigte verglichen zu `Fuji` einen deutlich rascheren Abbau der Fruchtfleischfestigkeit zu Lagerbeginn, verbunden mit einem zügigen Anstieg der Enzymaktivität sowie höheren Werten der Genexpression. Bei `Fuji` war dabei bis 42 Tage nach Lagerbeginn eine nur sehr geringe β -Galactosidase Aktivität zu messen. Bei beiden Sorten führte sowohl eine Temperaturabsenkung von 20°C auf 1°C als auch die Behandlung mit 1-MCP zu einer deutlichen Reduzierung von Enzymaktivität und Genexpression, wogegen mit Ethephon behandelte Äpfel höhere Enzymaktivitäten sowie bei `Golden Delicious` höhere Genexpressionswerte zeigten. Die Autoren folgerten, dass die β -Galactosidase eine wichtige Rolle für das Weichwerden von Äpfeln spielt, vor allem im frühen Stadium des Festigkeitsabbaus.

2.4.3.6 α -L-Arabinofuranosidase (AFase; EC 3.2.1.55)

Nach Redgwell et al. (1997b) gehört zu den ersten Veränderungen des Pektinmoleküls zu Beginn der Reifeprozesse die Abnahme an neutralen Zuckern, vor allem an Galactose und Arabinose. Beide befinden sich als Seitenketten der Rhamnosylreste am Hauptgerüst des Rhamnogalacturonan-Abschnittes. Der Abbau beider Glycosylreste erfolgt mit Hilfe der Aktivität von β -Galactosidasen (siehe Kapitel 2.4.3.5) und Arabinofuranosidasen (Fry, 1995; Beldmann et al., 1997). Arabinofuranosidasen gehören somit neben β -Galactosidasen zu den wichtigsten Glycosidasen (Wei et al., 2010). Das Freiwerden von Arabinosylresten wurde bei zahlreichen Obstarten beobachtet (Gross, 1984; Gross und Sams, 1984), wobei das Ausmaß des Arabinose-Abbaus nach Brummel (2006) von der jeweiligen Art abhängig ist. α -L-Arabinofuranosidasen katalysieren die Hydrolyse nicht-reduzierender Arabinofuranosyl-Reste in der Zellwand. Nach Tateishi (2008) scheint das Vorhandensein von Arabinosylresten, bestehend aus verschiedenen Zellwand-Polysacchariden, eine wichtige Rolle für die Adhäsion der Polysaccharide untereinander sowie für die Verbindung zwischen den Zellen zu haben. Ein Anstieg der Aktivität von Arabinofuranosidasen während der Reife konnte an Kaki-Früchten (Xu et al., 2003), Tomaten (Sozzi et al., 2002), Birnen (Tateishi et al.,

1996; 2005; Mwaniki et al. 2007), Erdbeeren (Rosli et al., 2009; Villareal, 2010) sowie an Äpfeln (Wei et al., 2010) nachgewiesen werden.

An Birnen konnten Tateishi et al. (2005) nach Aufreinigung des α -L-Arabinofuranosidase-Enzyms anhand von Northern-Blots zeigen, dass die entsprechende mRNA nur in reifenden Früchten stark exprimiert wird. Itai et al. (2003) konnten an der Tomatensorte 'Ailsa Craig' während der frühen Fruchtentwicklung hohe Aktivität der Arabinofuranosidase messen, jedoch während der Fruchtreife keine Zunahme feststellen. Sozzi et al. (2002) hingegen beobachteten an Tomaten bei zwei AFase-Isoformen eine Abnahme der Enzymaktivität, während bei einem dritten Isoenzym ein Anstieg zu verzeichnen war. In Untersuchungen an zwei verschiedenen Erdbeersorten stellten Rosli et al. (2009) eine Zunahme der AFase-Aktivität während der Fruchtreife fest, wobei bei der Sorte mit geringerer Fruchtfleischfestigkeit eine höhere spezifische AFase-Aktivität gemessen wurde. Villareal et al. (2010) konnten ebenfalls an Erdbeeren während 2 Tagen bei 22°C einen Anstieg der AFase-Aktivität messen. Eine Behandlung mit 1-MCP bzw. mit Etephon hatte dabei im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, woraus man schloss, dass die Aktivität des Enzyms nicht durch Ethylen reguliert wird. Im Gegensatz dazu war in Untersuchungen von Wei et al. (2010) mit Äpfeln der Sorten 'Golden Delicious' und 'Fuji' nach Behandlung mit 1-MCP sowie bei einer Temperaturabsenkung von 20°C auf 1°C eine deutliche Reduzierung der Enzymaktivität sowie der Genexpression der α -L-Arabinofuranosidase festzustellen. Die Applikation von Etephon hingegen führte zu einem Anstieg von Enzymaktivität und Genexpression. Die Autoren folgerten daraus, dass Arabinofuranosidasen auf Ethylen und niedrige Temperaturen reagieren und eine wichtige Rolle für das Weichwerden von Äpfeln spielen. Zwischen den beiden Sorten konnten Wei et al. (2010) ebenfalls deutliche Unterschiede feststellen. Die gemessene Aktivität der Arabinofuranosidase war in 'Golden Delicious', der Sorte mit intensiverem Festigkeitsabbau, höher als bei 'Fuji'. Auch war der Effekt von 1-MCP, tiefer Temperatur sowie Etephon auf Fruchtfleischfestigkeit, Enzymaktivität sowie Genexpression bei 'Golden Delicious' ausgeprägter als bei 'Fuji'. In Äpfeln läuft nach Peña und Carpita (2004) der Abbau hoch verzweigter Arabinane vor dem Einsetzen des Festigkeitsverlustes zu Beginn der Fruchtalterung ab. Dies konnten sie in Versuchen mit den Apfelsorten 'Gala', 'Red Delicious',

‘Firm Gold’ sowie ‘Gold Rush’ beobachten. Sie nahmen dabei an, dass der Abbau von Arabinanen nicht direkt für das Weichwerden der Früchte verantwortlich ist, jedoch eventuell Voraussetzung dafür ist, dass andere Zellwandkomponenten durch Enzyme modifiziert werden können. Goulao et al. (2007) konnten bei ‘Gala’ einen drastischen Anstieg der AFase-Aktivität von der Pflückreife bis ins überreife Stadium beobachten. Goulao et al. (2008) identifizierten an Äpfeln ein für die AFase kodierendes Gen, Md-AF1, das mit einem an Birnen identifizierten Gen, welches während der Reife hochreguliert wird, nahezu identisch war. Während bezüglich der mRNA-Akkumulation des für die β -Galactosidase kodierendem Gens pABG1 zur Ernte sowie über die Reife hinweg hohe Expressionswerte gemessen werden konnten, nahm die Transkription von Md-AF1 nach der Ernte ab, war jedoch zu jedem Zeitpunkt während der Nachernteperiode messbar. Nach Wei et al. (2010) scheinen β -Galactosidasen und α -L-Arabinofuranosidasen mehr in Beziehung zur Lagerfähigkeit von Äpfeln zu stehen als Polygalacturonasen sowie Pektinmethylesterasen, vor allem zu Beginn der Fruchtreife und des Festigkeitsabbaus.

2.4.3.7 β -D-Endoglucanase (EGase; E.C. 3.2.1.4)

Endoglucanasen katalysieren die hydrolytische Spaltung der 1,4- β -D-Glucanketten im Inneren der Zellulose. *In vitro* sind Endoglucanasen aktiv gegenüber den Modelsubstraten Carboxymethylzellulose (CMC), Xyloglucanen, Zello-Oligosacchariden sowie nicht kristalliner Zellulose (Hayashi et al., 1984; Hatfield und Nevins, 1986; Nakamura und Hayashi, 1993; Ohmiya et al., 1995). Nach Brummel und Harpster (2001) umfassen die *in vivo*-Substrate der Endoglucanasen möglicherweise Xyloglucan, innere und äußere Bereiche nicht kristalliner Zellulose, vor allem die äußeren Schichten der Zellulosefibrillen, an denen Glucanketten mit Xyloglucanketten verbunden sind, sowie möglicherweise Glucomannane. Nach Bonghi et al. (1998) nimmt die Endoglucanase-Aktivität während dem Fruchtwachstum ab. Während der Reife hingegen konnte ein Anstieg der EGase-Aktivität bei zahlreichen Fruchtarten, wie Erdbeeren (Abeles und Takeda, 1990), Pfirsich (Bonghi et al., 1998), Tomaten (Mac Lachlan und Brady, 1992), Himbeeren (Sexton et al., 1997) sowie Avocado (Awad und Young, 1979) dokumentiert werden, jedoch variiert die Intensität der Aktivität deutlich je nach Fruchtart (Brummel und Harpster, 2001). In Avocados liegt die gemessene Aktivität bezogen auf die

Frischmasse 160 mal höher als in Pfirsichfrüchten sowie 770 mal höher als in Tomaten (Lewis et al., 1974).

Die Rolle der Endoglucanasen für das Weichwerden von Äpfeln scheint gering bzw. noch unklar zu sein. Siddiqui et al. (2004) konnten trotz verschiedener Bestimmungsmethoden an `Golden Delicious` Äpfeln aus präklimakterischem sowie aus klimakterischem Reifestadium keine Aktivität von Endoglucanasen nachweisen. Goulao et al. (2007) konnten an Äpfeln der Sorte `Gala` die höchste Endo-1,4- β -Glucanase-Aktivität zum Zeitpunkt des Fruchtansatzes messen. Anschließend nahm während des Fruchtwachstums sowie nach der Ernte die Aktivität deutlich ab. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Abeles und Biles (1991) in Untersuchungen mit den Apfelsorten `Stark Lodi`, `Paulared` und `Golden Delicious`. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen klimakterischen Früchten konnten sie an Äpfeln keine Zunahme an extrahierbarer Endoglucanase während der Reife beobachten. Goulao et al. (2008) stellten an Untersuchungen mit `Gala` Äpfeln fest, dass Md-EG1, ein für die Endoglucanase kodierendes Gen, vor allem zum Zeitpunkt des Fruchtansatzes exprimiert wird. Anschließend war zwar ebenfalls Md-EG1-Expression vorhanden, jedoch kaum messbar. Im Gegensatz dazu konnte an Tomaten eine Akkumulation für Endoglucanase kodierender Gene, Le-Cel1, Le-Cel2, nicht nur in frühen Stadien der Zellstreckung, sondern auch während der Fruchtreife festgestellt werden (Lashbrook et al., 1994; Gonzales-Bosch et al., 1996; Brummel et al., 1997), was auf eine unterschiedliche Steuerung sowie Rolle des Enzyms in Tomaten und Äpfeln hinweist (Goulao et al., 2008).

3.4.3.8 Xyloglucan-Endotransglycosylase (XET; E.C. 2.4.1.207)

Obwohl beim Apfel während der Fruchtreife keine Veränderung der molekularen Masse der Hemizellulose-Fraktion aufzutreten scheint (Percy et al., 1997), ist bekannt, dass Modifizierungen der Struktur sowie der Verbindung zwischen den Zellwandpolysacchariden zu Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit führen (Goulao et al., 2007). Zu den Enzymen, welche auf das Zellulose-Hemizellulose-Netzwerk in der Zellwand wirken, zählen Endoglucanasen, Xyloglucan-Endotransglycosylasen sowie Expansin (Goulao et al., 2007). Nach Atkinson et al. (2009) geht man davon aus, dass Xyloglucan-Endotransglycosylasen eine wichtige Rolle während der Fruchtreife spielen, in dem sie zum Lösen der Zellwand als

Voraussetzung für die spätere Aktivität weiterer Enzyme sowie zum Abbau von Hemizellulosen beitragen. Im Gegensatz zu Endoglucanasen, welche an einer irreversiblen Spaltung der Xyloglucane beteiligt sind, handelt es sich bei der Spaltung mit Hilfe von Xyloglucan-Endotransglycosylasen um einen reversiblen Vorgang (Smith und Fry, 1991). Diese Enzyme katalysieren die Spaltung der internen Verbindungen des (1→4)β-D-Glucan Rückgrates des Xyloglucans und transferieren diese neu entstandenen, reduzierenden Enden der Xyloglucankette ("donor") an die C-4 Position der Glucoseeinheit an den nicht reduzierende Enden anderer Xyloglucanpolymere oder Oligosaccharide ("acceptor") (Farkas et al. 1992; Fry et al. 1992; Nishitani und Tominaga, 1992; Brummel und Harpster, 2001). Endotransglycosylasen ermöglichen Zellstreckung durch zeitweise Auflockerung der Zellwand in schnell wachsenden Zellen (Nishitani und Tominaga, 1992) und bauen neu gebildete Xyloglucanketten in die Zellwand ein (Fry et al., 1992). XET kodierende Gene konnten bei zahlreichen Fruchtarten wie z.B. Bananen (Lu et al., 2004), Birnen (Hiwasa et al., 2004), Kaki (Cutillas-Iturralde et al., 1994), Tomaten (Arrowsmith und de Silva, 1995) und Äpfeln (Goulao et al., 2008; Atkinson et al., 2009) identifiziert werden. In Versuchen von Asada et al. (1999) führte eine Unterdrückung des entsprechenden Gens Le-EXGT1 in grünen Tomatenfrüchten zu geringeren Fruchtgrößen. In reifen Früchten jedoch hatte eine Down-Regulierung von Le-EXGT1 hingegen keinen Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit (Brummel und Harpster, 2001).

Nach Goulao et al. (2007) sind bisherige Aussagen zur Aktivität der Xyloglucan-Endotransglycosylase teilweise widersprüchlich. Percy et al. (1996) konnten an Äpfeln der Sorte `Braeburn` die höchste XET-Aktivität während der ersten beiden Wochen der Zellteilungsphase feststellen. Nach anschließender Abnahme der Aktivität stieg diese im Laufe der Zellstreckungsphase bis zur Ernte wieder an. Während des Weichwerdens der Äpfel im Anschluss an die Ernte konnten Percy et al. (1996) eine erneute Abnahme der XET-Aktivität feststellen. Im Gegensatz zu den Äpfeln war bei Kiwi-Früchten im inneren Bereich des Fruchtfleisches auch eine Zunahme der XET-Aktivität nach der Ernte messbar. Sie schlossen aus ihren Beobachtungen, dass XETs Bedeutung für verschiedene Prozesse während der Pflanzen- bzw. Fruchtentwicklung haben können, von denen nicht alle in Verbindung mit dem Zellwandabbau stehen. Vincken et al. (1998) untersuchten bei

Jonagold` Äpfeln von Juni bis Mitte Oktober am Baum sowie während der anschließenden Lagerung bei 4°C Veränderungen der XET-Aktivität. Während in den ersten Monaten keine Enzymaktivität gemessen werden konnte, erfolgte ab September bis zur Ernte Mitte Oktober ein deutlicher Anstieg der XET-Aktivität. Im Anschluss an die Ernte während der Lagerung nahm diese wieder ab. Er schloss daraus, dass Xyloglucan-Endotransglycosylasen vermutlich weniger während des Fruchtwachstums, jedoch vor allem während der physiologischen Reife eine wichtige Rolle spielen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Redgwell und Frey (1993) in Untersuchungen an Kiwifrüchten. Dabei wurden durch Applikation von exogenem Ethylen die Reifeprozesse induziert. Sie schlossen aus ihren Untersuchungen, dass XET eine Rolle für das Weichwerden von Kiwifrüchten spielt. In Untersuchungen von Goulao et al. (2007) an Gala` Äpfeln war die gemessene Aktivität der Xyloglucan-Endotransglycosylase zum Zeitpunkt des Fruchtansatzes gering, stieg mit dem Ende des Größenwachstums bis zur Ernte stark an und blieb während dem anschließenden Weichwerden der Frucht auf hohem Niveau. In der Regel wird angenommen, dass die Aktivität von Endoglucanasen notwendig ist, um Oligosaccharide zu generieren, welche als Rezeptoren für die Aktivität der Xyloglucan-Endotransglycosylase dienen (Goulao et al., 2007). Obwohl beim Apfel zum Zeitpunkt des Fruchtansatzes hohe EGase Aktivitäten gemessen werden, scheint dies die Aktivität der XETs nicht zu beeinflussen. Goulao et al. (2007) nehmen daher an, dass beim Apfel die Aktivitäten beider Enzyme nicht voneinander abhängen. Zwei für Xyloglucan-Endotransglycosylasen kodierende Gene (Md-XTH1, Md-XTH10) konnten bei Äpfeln der Sorte Gala` identifiziert werden (Goulao et al., 2008). Die gemessene Expression beider Gene war in den Früchten zum Zeitpunkt der Ernte am höchsten und nahm anschließend während des Weichwerdens der Äpfel ab. Atkinson et al. (2009) konnten an Äpfeln der Sorte Grany Smith` insgesamt 11 verschiedene XTH-Gene isolieren, wobei, im Unterschied zu den Ergebnissen von Goulao et al. (2008) in reifen Früchten vor allem Md-XTH2 sowie Md-XTH10 exprimiert wurden, jedoch ein nur geringes Expressionslevel von Md-XTH1 gemessen werden konnte. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch sortenspezifische Expressionseigenschaften oder Unterschiede im Reifegrad der verwendeten Früchte liegen (Atkinson, 2009).

2.4.3.9 β -Xylosidase (β -Xyl; EC 3.2.1.37)

Entsprechend Angaben in der Literatur können β -Xylosidasen sowohl pektolytische Funktionen haben als auch am Abbau von Hemizellulosestrukturen beteiligt sein. Wichtige Bestandteile der Hemizellulosen stellen Arabinoxylane sowie Xylane dar (Carpita, 1987). Xylane bestehen aus β -D-Xylopyranosyl-Resten, welche das zentrale Rückgrat bilden und mit α -L-Arabinofuranosyl oder α -D-Glucuronsäure substituiert sein können. β -Xylosidasen katalysieren die Hydrolyse der β -1,4-D-Xylopyranosyl Verbindungen am Xylan, wobei β -D-Xylose vom nicht reduzierenden Ende frei wird (Itai et al., 2003).

Xylose liegt in den Zellwänden sowohl in Hemizellulosen als auch in Pektinen vor. Obwohl die Gehalte an β -Xylose in der Zellwand gering sind (Martinez et al., 2004), können sie für die Struktur der Zellwand wichtig sein. Nach Ortiz et al. (2008) kann die β -Xylosidase möglicherweise auch für die Solubilisierung von Pektinen, für die Freisetzung von Xylosyl oder anderen neutralen Zuckern aus den Seitenketten der Pektinpolymere sowie für Veränderungen der Verbindungen zwischen verschiedenen Polysacchariden von Bedeutung sein.

β -Xylosidase kodierende Gene wurden an pilzlichen Pathogenen intensiv untersucht, wogegen es nur wenige Informationen zu deren Vorkommen in Pflanzen gibt (Martinez et al. 2004). Über Untersuchungen zum Vorhandensein von β -Xylosidasen wurde unter anderem an Erdbeeren (Martinez et al., 2004), Birnen (Ahmed und Labavitch, 1980), Weizenmehl (Cleemput et al., 1997), Avocado (Ronen et al., 1991) und Pfirsichen (Rupert et al., 2002) berichtet. In Arabidopsis hatte eine down-Regulierung eines β -Xylosidase kodierenden Gens Ar-BXL1 Veränderungen der Zellwandkomposition sowie der Entwicklung der Pflanzen zur Folge (Goujon et al., 2003).

Martinez et al. (2004) untersuchten die Aktivität der β -Xylosidase sowie die Expression eines β -Xylosidase-kodierenden Gens Fa-Xyl1 während der Fruchtentwicklung und -reife von Erdbeeren. Mit Beginn der Fruchtreife zeigte sich dabei eine zunehmende Akkumulation von Fa-Xyl1 mRNA bis zu einem Maximum bei 25-50% Rotfärbung der Frucht, anschließend nahm diese in den reifen Früchten deutlich ab. Enzymatische Aktivität der β -Xylosidase konnte in

allen Reifestadien gemessen werden, jedoch auch mit einem Maximum bei 25-50% Rotfärbung der Frucht und anschließender Abnahme. Im Gegensatz dazu konnten Itai et al. (1999) an japanischen Birnen maximale Expressionswerte von JPR-XYL, einem β -D-Xylosidase kodierenden Gen, in überreifen Früchten feststellen. Die Expression von JPR-XYL nahm dabei während der Reife von unreifen zu reifen und überreifen Früchten zu, woraus Itai et al. (1999) schlossen, dass das entsprechende Gen für eine zellwandgebundene β -Xylosidase kodiert, welche den Abbau von Xylan oder Arabinoxylan in den Hemizellulosen katalysiert, wodurch es zum Verlust der Gewebefestigkeit kommt. Itai et al. (2003) untersuchten an Tomaten die Expression von zwei β -Xylosidase cDNAs, Le-Xyl1 und Le-Xyl2, sowie die Aktivität der β -Xylosidase während der Fruchtentwicklung und -reife. Sie stellten fest, dass Le-Xyl2 vor allem während der Fruchtentwicklung, jedoch nicht während der Reife exprimiert wird. Im Gegensatz dazu war bezüglich Le-Xyl1 während des Fruchtwachstums keine Expression zu messen, jedoch nahm die mRNA-Akkumulation vor allem während der Überreife deutlich zu. Die höchste β -Xylosidase-Aktivität konnte dabei während früher Wachstumsstadien gemessen werden, anschließend nahm diese während der weiteren Entwicklung und Reife ab. In den "non-ripening"-Mutanten *Nr*, *Nr2*, *nor* sowie *rin* der gleichen Sorte konnte Le-Xyl2 mRNA in reifen Früchten aller Mutanten gefunden werden. LeXyl1 mRNA hingegen wurde nur in reifen Früchten der *Nr*-Mutante gemessen. Eine Behandlung mit 1-MCP hatte weder bei LeXyl1 noch bei LeXyl2 Einfluss auf die Expression, was darauf hindeutet, dass beide Gene bei Tomaten nicht durch Ethylen gesteuert werden, die Regulierungsmechanismen der beiden Isoforme sich jedoch voneinander unterscheiden. In Untersuchungen von Ronen et al. (1991) an Avocado Früchten nahm die Aktivität der β -Xylosidase während der Fruchtreife zu und erreichte die höchsten Werte mit dem Maximum des klimakterischen Ethylenanstiegs.

Über die Bedeutung von β -Xylosidasen bei Äpfeln gibt es bisher kaum Studien. Ortiz et al. (2010) konnten an Früchten der Sorte `Fuji` nach CA (3 kPa O₂ ; 2 kPa CO₂) bzw. ULO (1 kPa O₂ ; 2 kPa CO₂)- Lagerung eine deutliche Inhibierung der β -Xylosidase Aktivität im Vergleich zur normalen Kühlung bei 1°C feststellen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen gelang es Dick et al. (1990) nicht, an der Sorte `Spartan` β -Xylosidase-Aktivität nachzuweisen.

3.4.3.10 Expansin (EXP)

Bei Expansinen handelt es sich um Zellwandproteine, welche eine Auflockerung der Zellwand während der Zellstreckungsphase induzieren können (McQueen-Mason et al., 1992; Cosgrove, 2000). Sie zeigen keine messbare Hydrolase- oder Transglycosylase-Aktivität und führen nicht zur Depolymerisation von Carboxymethylzellulose, Zellwandmatrix-Glycanen oder Pektinen (McQueen-Mason und Cosgrove, 1994; Darley et al., 2001), sondern man geht davon aus, dass sie an der Spaltung der Bindungen an der Oberfläche zwischen Zellulosen und Hemizellulosen beteiligt sind (Whitney et al., 2000). Nach Brummel und Harpster (2001) binden sich Expansine *in vitro* an kristalline Zellulose sowie vor allem an mit Matrix-Glycanen ummantelte Zellulose. Die Wirkung von Expansinen beruht vermutlich auf einer reversiblen Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulose-Mikrofibrillen und Matrix-Polysacchariden, vor allem Xyloglucanen, was eine Zellturgor-bedingte Verschiebung der Mikrofibrillen zur Folge hat (McQueen-Mason und Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000; Whitney et al., 2000). Nach Brummel (2001) und Harpster unterscheidet man zwei Arten von Expansinen: α -Expansin kommt vor allem in dikotylen Pflanzen vor, ist aber auch in Monokotylen zu finden. β -Expansin hingegen kommt hauptsächlich in Pollen von Gräsern vor, tritt jedoch auch in dikotylen Pflanzen auf (Cosgrove et al., 1997).

Im Laufe des Wachstums und der Reife von grünen Tomaten zeigen mindestens 6 Expansin kodierende Gene eine zum Teil gestaffelte, zum Teil überlappende mRNA-Akkumulation (Brummell et al., 1999b). Während der Reife von Tomaten ist vor allem die mRNA von drei Expansin kodierenden Genen präsent: mRNA von Le-Exp5, welche sehr früh während der Reife stark abnimmt, mRNA von Le-Exp3, welche langsam während der Reife abnimmt sowie Le-Exp1, welche durch die Reifephase hindurch auf hohem Expressionslevel gemessen werden kann (Rose et al., 1997; Brummell et al., 1999b). Während nach Brummel und Harpster (2001) in grünen Früchten exprimierte Expansine vor allem in den Prozess der Zellstreckung involviert sind, scheinen reifebezogene Expansine andere Zellwandmodifikationen zu katalysieren. In Versuchen von Brummell et al. (1999b) führte die Unterdrückung der Akkumulation des Exp1 Proteins auf 3% im Vergleich zum Wildtyp in transgenen Tomaten zu festeren Früchten sowie zu einer Inhibierung der Depolymerisation

von Pektinen während der späteren Reifestadien, konnte jedoch nicht den Abbau von Hemizellulosen unterbinden. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression des Exp1 Proteins zu weicheren Früchten. Dieses Weichwerden war mit intensiver Depolymerisation der Hemizellulosen verbunden, wogegen die Depolymerisation von Pektinen nicht verändert wurde. Als Ursache für diese Beobachtungen sehen Brummel et al. (1999b) drei Komponenten für das Weichwerden sowie Texturveränderungen bei Tomaten: eine Lockerung der Zellwand direkt durch die Aktivität von Exp1, eine limitierende Funktion von Expansin auf die Depolymerisation von Pektinen während der späteren Fruchtreife, evtl. durch Einfluss auf die Substratverfügbarkeit verschiedener Pektinasen, sowie eine Depolymerisation der Hemizellulosen, welche unabhängig oder bereits durch sehr geringe Mengen an Exp1 Protein abläuft (Brummel et al., 1999b). Nach Rose et al. (1997) wird die Expression von Le-Exp1 bei Tomaten durch Ethylen positiv reguliert.

Civello et al. (1999) konnten an Erdbeeren, als Model einer nicht klimakterischen Frucht, ein Expansin kodierendes, reife-reguliertes Gen Fa-Exp2, isolieren. Eine Akkumulation von Fa-Exp2 mRNA war dabei mit Beginn der Fruchtreife zu messen und nahm bis zu mittlerem Reifestadium deutlich zu. Im Gegensatz zu den meisten anderen reiferegulierten Genen in Erdbeeren zeigte sich jedoch die Expression von Fa-Exp2 nicht ausschließlich durch Auxine gesteuert, woraus Civello et al. (1999) schlossen, dass an Erdbeeren neben Auxinen andere nicht-klimakterische Signale für die Steuerung der Reifeinduzierung verantwortlich sind.

Bei der Apfelsorte `Golden Delicious` konnten Wakasa et al. (2003) sechs Expansin kodierende Gene aus Trieben (Md-Exp1), aus dem Fruchtfleisch reifender Früchte (Md-Exp2, Md-Exp3, Md-Exp4) sowie aus dem Gewebe der Fruchstiele (Md-Exp5, Md-Exp6) isolieren. Unter den untersuchten Genen im Fruchtfleisch reifender Früchte stellte sich Md-Exp3 als Reife-bezogenes Gen heraus. Die Expression des Gens nahm während der Fruchtreife in etwa parallel mit dem klimakterischen Anstieg der Ethylenproduktion zu. Durch Behandlung mit 1-MCP konnte die Expression von Md-Exp3 nahezu vollständig inhibiert werden, woraus Wakasa et al. (2003) schlossen, dass Md-Exp3 beim Apfel durch Ethylen reguliert wird. Md-Exp2 wurde mit Beginn der Zellstreckungsphase exprimiert. Bei der Expression von Md-Exp3 sowie Md-Exp4 wurde zudem während Zellteilung sowie Zellstreckung ein "up-down-up-

Zyklus“ beobachtet. Goulao et al. (2008) stellten an `Gala` Äpfeln einen Beginn der Transkription von Md-EXPA3 zum Zeitpunkt des Fruchtansatzes fest. Anschließend stieg diese bis auf maximale Werte zur Ernte an und nahm danach langsam wieder ab. Kasai et al. (2008) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Expression von Md-EXPA3 im Exokarp sowie Mesokarp von `Fuji` Äpfeln und dem Auftreten von “Cracking“ (Aufplatzen der Früchte). Da ein Spannungsabbau in den Zellwänden durch Reduzierung des Zellurgors das Wasserpotential in den Zellen verändert, können Expansine nach Kasai et al. (2008) durch Förderung der Wasseraufnahme eine Streckung der Zellen induzieren. In den Untersuchungen an `Fuji` konnten sie feststellen, dass das Aufplatzen der Früchte vor allem dann auftrat, wenn im Exokarp der Früchte geringere Mengen an Md-EXPA3 mRNA gemessen wurden als im Mesokarp. Nach Kasai et al. (2008) kommt es dadurch womöglich im Mesokarp zu einer stärker ausgeprägten Zellstreckung als im Exokarp, was in der Phase des Wachstums durch Spannungen zu winzigen Rissen und somit zum Aufplatzen der Früchte führen kann.

2.5. Einflussfaktoren auf die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel

Die Fruchtfleischfestigkeit wird sowohl durch Vorernte- wie auch Nacherntefaktoren bestimmt. Während vor der Ernte der Aufbau der Fruchtqualität die Grundlagen für die spätere Haltbarkeit und Frucht reife bildet, zielen die Nacherntemaßnahmen darauf ab, die gebildeten Qualitätseigenschaften möglichst optimal zu erhalten. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die die Fruchtfleischfestigkeit bestimmenden Vorerntefaktoren gegeben. Anschließend wird ausführlicher auf die Wirkung der Lagerbedingungen eingegangen.

2.5.1 Vorernte Faktoren

Nach Sams et al. (1999) beeinflussen sowohl Umweltfaktoren und Kulturmaßnahmen wie auch physiologische und genetische Faktoren die Fruchtfleischfestigkeit. Jahres- sowie standortabhängige Einflüsse werden in der Literatur mehrfach belegt (Luton und Holland,

1986; Knee und Smith, 1989). Dabei sind sowohl die jeweiligen Lichtverhältnisse wie auch die entsprechenden Voraussetzungen bezüglich Temperatur und Feuchtigkeit bzw. Niederschlag von Bedeutung (Johnston et al., 2002a). Nach Blanpied et al. (1978) zeigen zum Beispiel Äpfel aus schattigen, inneren Kronenbereichen um ca. 3 N geringere Festigkeitswerte als sonnenexponierte Früchte.

Kulturmaßnahmen wie die Nährstoffversorgung der Pflanze bzw. der Frucht, Maßnahmen der Behangsregulierung, Schnittmaßnahmen sowie der Einsatz von Wachstumsregulatoren spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Entwicklung der Festigkeitseigenschaften (Sams, 1999). Nach Blanpied et al. (1978) und Link et al. (2002) führt eine zunehmende Stickstoff (N)-Versorgung der Früchte zu abnehmenden Festigkeitswerten. Eine deutliche N-Übersorgung kann zu drastischem Festigkeitsverlust nach der Ernte führen (Link, 2002), was vor allem auf die Größe und damit Stabilität der Zellen zurückzuführen ist. Hipps und Perring (1989) konnten in einem mehrjährigen N-Düngeversuch in Anlagen mit höherer, jährlicher Stickstoffgabe ($189 \text{ kg N} \times \text{ha}^{-1}$) etwas größere Früchte mit geringerer Fruchtfleischfestigkeit ernten als in den Anlagen mit niedrigerer N-Menge ($63 \text{ kg N} \times \text{ha}^{-1}$). Das Auftreten physiologischer Lagerkrankheiten in Verbindung mit ungünstigen Textureigenschaften wird bei Übersorgung der Früchte mit Kalium und einem daraus resultierenden niedrigen Kalium/Calcium-Verhältnis gefördert (Bramlage et al., 1983). Calciumspritzungen gehören in der obstbaulichen Praxis, vor allem bei Sorten, welche zu Ca-Mangelercheinungen neigen, zu den Standardmaßnahmen um das Auftreten physiologischer Fruchterkrankungen zu reduzieren. Die Bedeutung von Calcium beruht vor allem auf dessen Rolle für die Stabilität der Zellwand auf Grund seiner gelbildenden, pektinvernetzenden Eigenschaften (siehe Kapitel 2.4.2.) (Sams und Conway, 1984; Glenn und Poovaiah, 1990; Poovaiah, 1993; Siddiqui und Bangerth, 1993; Stow et al., 1993). Laut Raese und Drake (1993) können Calciumspritzungen vor der Ernte sogar zu einer Erhöhung der Fruchtfleischfestigkeit führen, wogegen nach Link et al. (2002) in zahlreichen Ca-Düngeversuchen dies nicht erreicht werden konnte.

Neben den genannten kulturtechnischen Maßnahmen bestimmen auch physiologische Eigenschaften die Fruchtfleischfestigkeit. Nach Sams (1999) besteht eine negative

Korrelation zwischen Fruchtgröße und Fruchtfleischfestigkeit. In Früchten jüngerer Bäume erfolgt der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit nach der Ernte meist schneller als in solchen von älteren Bäumen, was auf die größeren Fruchtkaliber bei niedrigerem Fruchtbehang zurückzuführen ist (Streif, 2002). Mit zunehmender Zelldichte steigt auch die Festigkeit des Fruchtgewebes (Friedrich und Fischer, 2000).

Bei Äpfeln besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Festigkeit zur Ernte sowie dem Festigkeitsverhalten nach der Ernte (Knee und Smith, 1989). Da die Früchte mit zunehmender Reife an Festigkeit verlieren, weisen Äpfel von späteren Ernteterminen in der Regel eine geringere Fruchtfleischfestigkeit auf als früher geerntete (Sams, 1999). Dementsprechend ist der optimale Erntetermin für Langzeitlagerung so zu wählen, dass die Frucht zwar ausreichend biochemisch entwickelt ist, die physiologischen Reifeprozesse jedoch erst beginnen (Streif et al., 2010).

2.5.2. Nacherntefaktoren

2.5.2.1 Temperatur und Luftfeuchte

Die Regelung der Temperatur im Lager stellt den bedeutendsten Faktor zur Verlängerung der Haltbarkeit und zum Erhalt der Fruchtqualität dar. Eine Absenkung der Temperatur führt vor allem zur Verlangsamung der Stoffwechselprozesse in der Frucht (Mitchell, 1992; Kader, 2002; Lurie, 2002; Watkins, 2002; Burg, 2004). Nach der Van't Hoff'schen Regel (Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel) wird bei einer Temperaturerniedrigung um 10°C die Aktivität der Enzyme, welche Reife und Stoffumsatz steuern, um das Zwei- bis Dreifache verlangsamt (Streif, 2002). Ein weiterer reifeinhibierender Effekt niedriger Lagertemperaturen basiert auf deren Einfluss auf die Ethylenproduktion bzw. -wirkung. Zum Beispiel bei Äpfeln führt eine Absenkung der Temperatur zur Verzögerung des klimakterischen Ethylenanstiegs (Knee et al., 1983). Die beiden Enzyme ACC-Synthase und ACC-Oxidase, welche eine entscheidende Rolle während der Ethylenbiosynthese spielen, reagieren temperaturabhängig. Die Absenkung der Temperatur führt zu einer geringeren Aktivität beider Enzyme und somit zur Reduzierung der Ethylensynthese (Larrigaudierre et al., 1997).

Das Schrumpfen der Früchte im Lager in Folge von Wasserverlust wird ebenfalls deutlich durch die Temperatur beeinflusst. Die Wasserabgabe der Frucht hängt vor allem von der Dampfdruckdifferenz zwischen der Frucht und der Umgebungsluft ab, welche wiederum in Beziehung zur Temperatur sowie zur relativen Feuchte steht. Da kühlere Luft im gesättigten Zustand weniger Wasserdampf aufnehmen kann, ist die Wasserabgabe und somit der Gewichtsverlust bei niedrigen Temperaturen geringer (Kader, 2002; Lurie, 2002).

Ein weiterer Punkt, der deutlich von der Lagertemperatur abhängt, ist die Keimung sowie das Wachstum pathogener Pilze. Bei Temperaturen unter 2°C zum Beispiel wird das Mycelwachstum von *Botrytis cinerea* gehemmt sowie gekeimte Sporen dringen nicht in die Frucht ein (Sommer, 1985).

2.5.2.2 Kontrollierte Atmosphäre (CA-Bedingungen)

Überblick CA-Lagerung

Kidd und West (1927; 1934) fanden bereits in der ersten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts, dass niedrige Sauerstoff (O₂)- sowie erhöhte Kohlendioxid (CO₂)-Konzentrationen in der Atmosphäre die Respiration klimakterischer Früchte inhibieren und sich positiv auf die Lagerdauer von Äpfeln auswirken können. Burg und Burg konnten 1962 zeigen, dass die physiologische und biochemische Wirkung dieser veränderten Atmosphäre nicht nur auf einer Reduzierung der Fruchtatmung, sondern auch auf einer Inhibierung der Ethylenbildung und -wirkung basiert. Bei den meisten Frucht- bzw. Gemüsearten verbessert eine Absenkung der O₂- bzw. ein Anheben der CO₂-Gehalte in der Atmosphäre die Haltbarkeit (Kader et al., 1989). Fortschritte in der CA-Technik in den vergangenen Jahrzehnten haben zu verbesserten Möglichkeiten der Kontrolle und Regelung der Gaskonzentrationen im Lager, zu einer verbesserten Isolierung und Gasdichte der Räume, effektiveren Stickstoffmaschinen sowie einer verbesserten CO₂-Adsorber-Technik mit geringerem O₂-Eintrag in den Raum während des Adsorptionsvorganges geführt (Malcolm, 2005).

Die Lagerung in kontrollierter Atmosphäre (CA) führt in der Regel zu einer Reduzierung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme und somit zu einem verbesserten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit, zu einem reduzierten Säure- sowie Stärkeabbau, zu einem langsameren Um- bzw. Abbau von Monosacchariden sowie zu einer gehemmten Synthese von Aromastoffen. Desweiteren können CA-Bedingungen den Abbau von Chlorophyll sowie die Synthese von Carotinoiden sowie Antocyanen und die Biosynthese und Oxidation phenolischer Verbindungen verzögern (Forsyth und Eaves, 1975; Brackmann et al., 1995; Yahia, 2010).

Die Wirkung der CA-Lagerung auf den Erhalt der Fruchtqualität basiert zum einen auf deren Einfluss auf die Stoffwechselprozesse, welche in einer reduzierten Fruchtatmung resultieren (Watkins, 2002), zum anderen auf der Inhibierung der Ethylensynthese sowie -Wirkung (Bufler und Streif, 1986). Nach Mir und Beaudry (2002) können O₂ und CO₂ als wichtige Bestandteile zahlreicher chemischer Reaktionen viele Prozesse in der Pflanzenzelle beeinflussen, wie die Stoffwechselprozesse z.B. von Farbstoffen, Phenolen, Zellwandbestandteilen, Aromastoffen, Stärke, organischen Säuren usw.. Nach Kanellis (1993) kann Sauerstoffmangel im Gewebe sowohl die Synthese neuer Proteine, unabhängig vom Entwicklungszustand der Frucht, induzieren, wie auch die Neusynthese bestimmter Enzyme in reifenden Früchten unterdrücken. Metzidakis und Sfakiotakis (1993) konnten an Avocados ein reduziertes Weichwerden der Frucht in Verbindung mit geringerer endo-1-4 Glucanase-Aktivität, Cellulase mRNA und geringerer Polygalacturonase-Aktivität durch Absenkung der O₂-Gehalte von 5 kPa auf 1 kPa feststellen. Bei Kanellis et al. (1991) führte eine Absenkung der O₂-Konzentration ebenfalls bei Avocados zu einer Förderung der Synthese von Alkohol-Dehydrogenase Isozymen.

Zahlreiche Studien, die sich mit der Wirkung kontrollierter Atmosphäre befassen, haben die Wirkung reduzierter O₂-Konzentrationen in Kombination mit erhöhten CO₂-Konzentrationen untersucht, weshalb es zum Teil schwierig ist, die Wirkung der beiden Gase getrennt voneinander zu beurteilen (Mathooko, 1996).

Einfluss von O₂ und CO₂ auf die Fruchtatmung

Eine Regulierung der Respiration kann durch Beeinflussung der drei Hauptprozesse der Fruchtatmung erfolgen, der Glykolyse, dem Zitronensäurezyklus und der Atmungskette (Mathooko, 1996). Eine schnelle Abnahme der Atmungsintensität, reduzierte Gewinnung von Energie in Form von ATP sowie eine entsprechende Herunterregulierung von Zitronensäurezyklus und Glykolyse sind nach Solomos (1982) und Geigenberger (2003) die ersten Stoffwechselreaktionen auf niedrige O₂-Konzentrationen. Der Stoffwechselweg, der hauptsächlich durch die O₂-Konzentration beeinflusst wird, ist die mitochondriale Atmung. Eine Absenkung des Gehaltes an O₂, welches als Elektronenakzeptor im letzten Schritt des Atmungsstoffwechsels, der Atmungskette, dient, verhindert die Oxidation der Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse bzw. dem Zitronensäurezyklus. Dies führt zum Unterbinden der ATP-Produktion und somit zum Einstellen der Glykolyse. (Kader et al. 2002; Mir und Beaudry, 2002; Taiz und Zeiger, 2007; Kanellis et al., 2010).

Die Wirkung von O₂ auf den Zitronensäurezyklus ist nach Mir und Beaudry (2002) mehr ein indirekter, substratlimitierender Effekt durch die inhibierende Wirkung auf den Elektronentransport in der Atmungskette, als ein direkter Einfluss. Im Zitronensäurezyklus wird folglich der Umbau von Pyruvat zu Citrat sowie von α -Ketoglutarat zu Succinat beeinträchtigt. Desweiteren kann die Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre auch Einfluss auf spezifische Enzyme der Glykolyse, dem ersten Schritt des Atmungsstoffwechsels, nehmen, und zwar auf die Saccharose-Synthase, die ATP abhängige Phosphofructokinase sowie die Pyruvatkinase.

Unter anaeroben Bedingungen kann durch Umschalten auf den Gärungsstoffwechsel weiterhin Energie produziert werden, wobei die Ausbeute deutlich geringer ist als bei der aeroben Respiration (Kanellis et al., 2010). Bei zu niedrigen O₂-Gehalten (Mir und Beaudry, 2002) bzw. zu hohen CO₂-Konzentrationen kann es in Folge der gehemmten mitochondrialen Aktivität zur Fermentation und dabei zur Umwandlung von Pyruvat in Acetaldehyd und Ethanol mittels Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH) kommen (Shipway und Bramlage, 1973; Ke et al. 1994) (siehe Kapitel 2.2.2).

Erhöhte CO_2 -Konzentrationen führen zur Inhibierung verschiedener Enzyme des Atmungsstoffwechsels (Kerbel et al., 1990; Ke et al., 1993) und haben, vermutlich durch direkten Einfluss auf die Aktivität in den Mitochondrien, einen Entkoppelungseffekt auf die oxidative Phosphorylierung (Fanestil, 1963; Kader, 1986). Eine Hemmung verschiedener Enzyme des Zitronensäurezyklus, vor allem der Succinat-Hydrogenase, kann dabei zur Akkumulation von Succinat, einem für Pflanzengewebe giftigen Stoff, führen (Frenkel und Patterson, 1973; Knee, 1973; Shipway und Bramlage, 1973; Monning, 1983; Romo-Parada et al., 1989; Ke et al., 1993).

Die Steuerung des Zitronensäurezyklus erfolgt weitgehend in Abhängigkeit des mitochondrialen Energiestatus (Mathooko, 1996). Erhöhte CO_2 -Konzentrationen wirken inhibierend auf die Aktivität der Mitochondrien bzw. auf die Aktivität der sich darin befindlichen Enzyme der oxidativen Phosphorylierung, wodurch sich der reduzierende Effekt auf die Fruchtatmung erklären lässt (Ranson et al., 1960; Shipway und Bramlage, 1973). Somit beeinflusst CO_2 den Zitronensäurezyklus direkt auf Ebene der beteiligten Enzyme, im Gegensatz zu O_2 , welches indirekt über seinen Effekt auf die Elektronentransportkette wirkt (Mir und Beaudry, 2002).

Nach Mathooko (1996) kann der Wirkungsmechanismus von CO_2 auf die Respiration auf pH-Wert Veränderungen im Zytoplasma, die Unterdrückung oder Induzierung der Proteinsynthese, die Aktivierung oder Inaktivierung bereits existierender Enzyme, die Induzierung von Isoenzymen, einer antagonistischen Wirkung gegenüber Ethylen oder dem Einfluss auf die Polyamingehalte zurückzuführen sein. Kubo et al. (1989) konnten zeigen, dass CO_2 bei klimakterischen Früchten im nicht klimakterischen Stadium kaum eine reduzierende Wirkung auf die Respiration hatte, wogegen der Effekt im klimakterischen Stadium deutlich war. Dies deutet darauf hin, dass der inhibierende Effekt von CO_2 auf die Atmungsaktivität zumindest teilweise mehr auf dessen hemmenden Effekt auf die Ethylenwirkung als auf dessen direkten Effekt auf den Atmungsstoffwechsel zurückzuführen ist (Mathooko, 1996).

Einfluss von O₂ und CO₂ auf Ethylensynthese und -wirkung

Die Lagerung in kontrollierter Atmosphäre führt sowohl zu einer reduzierten Ethylenbildung wie auch zu einer geringeren Reaktionsempfindlichkeit der Frucht auf Ethylen (Kader et al., 2002). Nach Solomos (2000) erfordert eine wirksame Verzögerung des klimakterischen Ethylenanstiegs bei Gala Äpfeln ein Absenken der O₂-Konzentrationen unter 6 kPa. Für die kommerzielle CA bzw. ULO- Lagerung von Äpfeln liegen die Sauerstoffwerte im Lager, je nach Sorte und technischen Möglichkeiten, zwischen 1 kPa und 3 kPa.

Da für die Aktivität der ACC-Oxidase Sauerstoff notwendig ist, führen niedrige O₂-Konzentrationen in der Atmosphäre zu einer Unterdrückung der ACC-Oxidase und damit Ethylenbildung (Adams and Yang, 1979; John, 1997). In Untersuchungen an Äpfeln führte ein Absenken der O₂-Konzentrationen nur zu einer Inhibierung der Umwandlung von ACC zu Ethylen (Li et al., 1983), wogegen eine Erhöhung der CO₂-Konzentrationen zusätzlich die Synthese von ACC hemmte (Li et al. 1983; Chaves und Thomas, 1984; Bufler und Streif, 1986). Erhöhte CO₂-Gehalte in der Atmosphäre können fördernden, hemmenden oder keinen Einfluss auf die Ethylensynthese haben (Mathooko, 1996). Gorny und Kader (1997) konnten an Äpfeln sowohl im präklimakterischen als auch im klimakterischen Stadium eine deutliche Reduzierung der ACC-Synthase mRNA und eine folglich verminderte Ethylensynthese durch erhöhte CO₂- (20 kPa) oder geringe O₂- Konzentrationen (0,25 kPa) feststellen. ACC-Oxidase Transkription, Proteinmenge sowie Enzymaktivität wurde dagegen durch die entsprechenden O₂- und CO₂-Konzentrationen vor allem an präklimakterischen Früchten gehemmt, wogegen der Einfluss im klimakterischen Stadium gering war.

Burg und Burg (1967) beschrieben eine kompetitive Hemmwirkung von CO₂ gegenüber Ethylen, indem CO₂ die Ethylenrezeptoren besetzt. De Wild (1999) hingegen konnte an 1-MCP behandelten Birnen eine vergleichbare Wirkung von CO₂-Behandlungen (5 kPa) auf die Ethylenproduktion feststellen wie bei Kontrollfrüchten ohne 1-MCP. Dies spricht gegen einen kompetitiven Effekt und für zwei getrennte Hemmmechanismen. Nach Kader et al. (2002) nimmt bei klimakterischen Früchten die Reaktionsempfindlichkeit auf Ethylen bei O₂-Konzentrationen < 8kPa oder CO₂-Konzentrationen > 1kPa ab. Eine Stimulierung der Ethylenproduktion in Folge hoher CO₂-Konzentrationen ist nach Mathooko (1996) auf eine

Akkumulation von ACC sowie eine gestiegene Aktivität von ACC-Synthase und-Oxidase zurückzuführen.

Abbildung 7 zeigt schematisch Biosynthese und Wirkungsmechanismus von Ethylen sowie entsprechende Möglichkeiten der Reifeinhibierung durch CA-Lagerbedingungen sowie dem Einsatz von 1-MCP (siehe Kapitel 2.5.2.3).

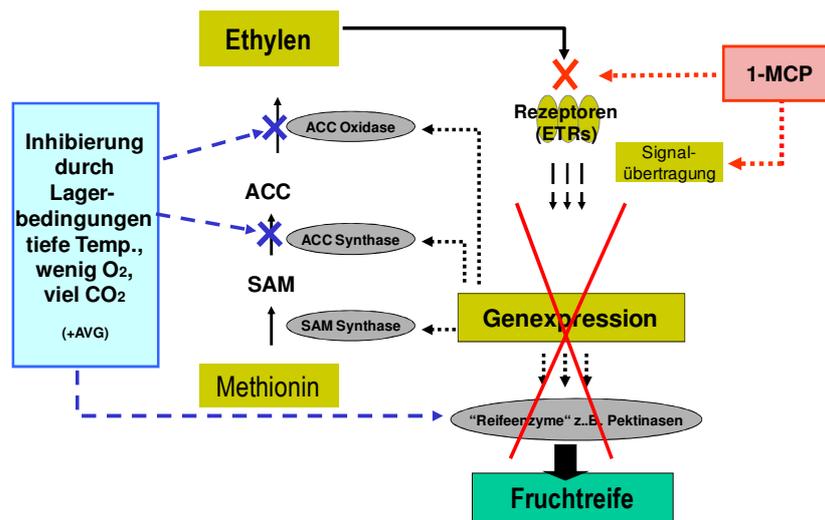


Abbildung 7: Biosynthese und Wirkungsmechanismus von Ethylen sowie entsprechende Möglichkeiten der Reifeinhibierung durch CA-Lagerbedingungen sowie dem Einsatz von 1-MCP (Streif, 2008).

2.5.2.3 Einsatz von 1-Methylcyclopropen (1-MCP)

Die Anwendung des Ethyleninhibitors 1-Methylcyclopropen (1-MCP) in der Lagerpraxis hat in den vergangenen Jahren zu neuen Möglichkeiten der Reifesteuerung bei klimakterischen Früchten geführt. Es handelt sich dabei um eine gasförmige Verbindung, welche bereits in sehr geringen Konzentrationen die reifeinduzierende Wirkung von Ethylen unterdrücken kann. Die Entdeckung dieses Reifeinhibitors begann in den 1980er Jahren durch Sisler und Blankenship, welche nach einer Substanz suchten, die sich an die Ethylenrezeptoren bindet und somit als Marker zur Erforschung der Rezeptoraktivität verwendet werden kann (Blankenship und Dole, 2003). 1996 wurde 1-MCP als Ethylen inhibierende Verbindung zum Patent angemeldet (Sisler und Blankenship, 1996).

Der Wirkungsmechanismus von Ethylen basiert nach Binder und Bleeker (2003) auf einem negativ regulierten Model der Ethylenrezeptor-Funktion (siehe Kapitel 2.2.3.2). 1-MCP hemmt die Ethylenwirkung, indem es sich an die Ethylenrezeptoren bindet, wodurch die Serin-Threonin-Kinase (CTR1) im aktiven, also die weiteren Reifevorgänge inhibierenden Zustand bleibt (Binder und Bleeker, 2003). Wie sich 1-MCP an die Rezeptoren bindet und warum es dabei nicht wie bei Ethylen zu einer Deaktivierung der Rezeptoren kommt, ist bislang noch unklar (Prange und DeLong, 2003).

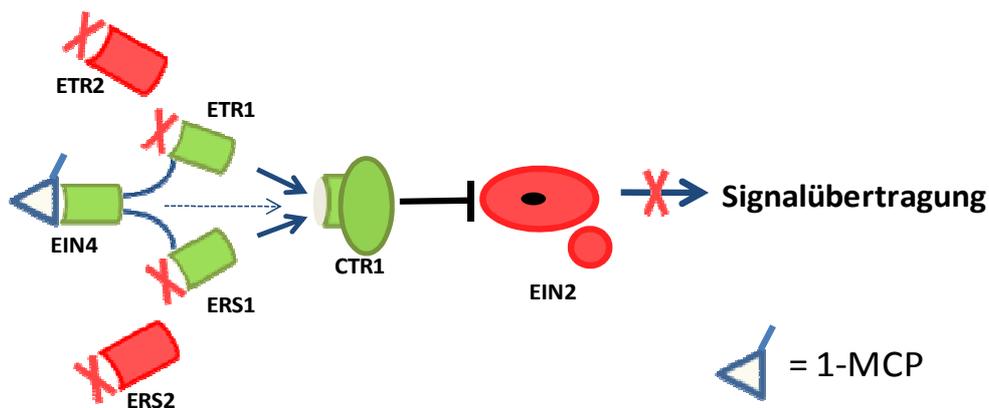


Abbildung 8: Wirkungsmechanismus von 1-MCP: durch Bindung an die Ethylenrezeptoren werden diese im aktiven, inhibitorischem Zustand gehalten (verändert nach Binder und Bleeker, 2003).

1-MCP ist in verschiedenen Ländern für die Anwendung bei zahlreichen Fruchtarten, wie Apfel, Birne, Pfirsich, Nektarine, Mango, Papaya und anderen klimakterischen Früchten registriert (Watkins, 2006).

Beim Apfel führt 1-MCP zu einer deutlichen Inhibierung der Reifeprozesse. Die mit dem klimakterischen Reifeanstieg verbundene Zunahme der Ethylenproduktion wird dabei verlangsamt bzw. ganz unterdrückt, wobei die Wirkung von Sorte, Reifezustand, Lagermethode und Lagerdauer abhängig ist. Zudem bewirkt 1-MCP eine deutliche Reduzierung der Respirationsrate der Frucht (Fan et al., 1999; Fan und Mattheis, 1999; Rupasinghe et al., 2000; Watkins et al., 2000; Jiang und Joyce, 2002).

Durch den inhibierenden Effekt auf Ethylenwirkung bzw. -produktion sowie Atmungsrate bewirkt 1-MCP eine Verlangsamung bzw. Unterdrückung zahlreicher Reifevorgänge. Einer der Hauptvorteile liegt dabei in der lange anhaltenden reifeverzögernden Wirkung auch während der Shelf-life-Phase (Streif et al., 2010). Dabei wird besonders der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit verzögert, die Früchte bleiben länger fest und knackig (Fan et al. 1999; Baritelle et al. 2001; Younes und Streif, 2005).

Es gibt bisher wenige Untersuchungen zu Zellwandveränderungen in 1-MCP behandelten Früchten, jedoch wurden bei einigen Obstarten Studien zur Aktivität zellwandabbauender Enzyme durchgeführt (Watkins, 2006). Liu et al. (2005) konnten zum Beispiel an 1-MCP behandelten Pfirsichen einen verzögerten Anstieg an gelösten Pektinen feststellen. In 1-MCP behandelten Avocados wurden eine verzögerte Solubilisierung und ein verzögerter Abbau von Polyuroniden (Jeong und Huber, 2004) sowie geringere Aktivitäten von Polygalacturonase (PG) und Endoglucanase (EGase) gemessen. Balogh et al. (2005) konnte an Erdbeeren einen Einfluss von 1-MCP auf die Expression Zellwandbezogener Gene feststellen (weitere Angaben zur Wirkung von 1-MCP auf Genexpression und Enzymaktivität siehe Kapitel 3.4.3).

Neben dem Effekt auf die Fruchtfleischfestigkeit führt die Anwendung von 1-MCP zu einem verzögerten Abbau titrierbarer Säuren (Fan und Mattheis 2001; Zanella, 2003), sowie zu einem verzögerten Chlorophyllabbau und damit verbesserten Erhalt der grünen Grundfarbe (Fan und Mattheis, 2001). Der Einfluss auf den Gehalt an löslicher Trockensubstanz hingegen ist relativ gering (DeEll et al., 2002). Ein Nachteil bezüglich der geschmacklichen Qualität liegt in der reduzierten Aromastoffbildung 1-MCP behandelter Früchte (Xuan und Streif, 2005). 1-MCP führt beim Apfel zu einer reduzierten Esterbildung, wogegen die Wirkung auf andere Aromakomponenten je nach Sorte und Lagerbedingungen unterschiedlich sein kann (Fan und Mattheis, 1999; Defilippi et al. 2004; Mattheis et al., 2005). Nach Saquet et al. (2003) ist die Verfügbarkeit energiereicher Verbindungen für die Biosynthese von Fettsäuren und Aromastoffen durch die Lagerung unter CA-Bedingungen sowie in ähnlicher Weise durch die Applikation von 1-MCP limitiert.

Neben den genannten Aspekten kann sich der Einsatz von 1-MCP sowohl positiv wie auch negativ auf das Auftreten physiologischer Lagerkrankheiten auswirken (Watkins und Miller, 2005). Das Auftreten von Schalenbräune (*soft scald*) zum Beispiel kann durch 1-MCP reduziert werden, wogegen Apfelsorten, die zu inneren Verbräunungen neigen, wie `Braeburn`, auf Grund der Symptom verstärkenden Wirkung von 1-MCP nicht behandelt werden sollten.

Konsumentenstudien mit `Elstar` Äpfeln zeigten, dass sich die reifeinhibierende Wirkung von 1-MCP bei kurzer Lagerdauer unter Umständen negativ auf die Akzeptanz beim Kunden auswirken kann, bei längerer Lagerung hingegen in der Regel einen deutlichen Vorteil darstellt (McCormick et al., 2008).

2.6. Ziel der Arbeit

Ausgehend von den bisherigen Darstellungen sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit in Zusammenhang mit dem Zellwandabbau beim Apfel während der Lagerung betrachtet werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei der zentralen Rolle von Ethylen für die Steuerung der reifebezogenen Texturveränderungen.

Im Zuge der durchgeführten Versuche werden die wichtigsten, die Fruchtfleischfestigkeit beeinflussenden Faktoren und deren Wirkung auf Veränderungen im Bereich der Zellwände, die Genexpression und Aktivität zellwandabbauender Enzyme sowie die Fruchtreife beim Apfel genauer untersucht.

Dabei sollen vor allem folgende Themen- bzw. Fragestellungen bearbeitet werden:

- Verbessertes Verständnis zu Festigkeitsveränderungen während des Reifeprozesses bei Apfelfrüchten
- Wodurch unterscheiden sich Sorten mit unterschiedlich starkem Festigkeitsabbau?
- Welche Rolle spielen einzelne zellwandabbauende Enzyme für das Weichwerden beim Apfel?
- Welches sind die physiologischen Ursachen für die Wirkung von Lagerverfahren auf die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel?
- Welche Rolle spielt Ethylen für den Festigkeitsverlust und Zellwandabbau sowie für die Regulierung dieser Veränderungen?
- Auf welchen physiologischen Ursachen basiert die zum Teil nahezu komplette Inhibierung des Festigkeitsabbaus durch 1-MCP?
- Welche Rolle spielt Calcium für Texturveränderungen beim Apfel während der Lagerung?

Zur Klärung dieser Fragen wurde der Einfluss von Sorte, Lagerbedingungen bzw. Lagerverfahren (Kühllager, ULO/CA-Lager, 1-MCP), Lagerdauer, Calciumversorgung der Früchte sowie Ethylen auf folgende Parameter während der Fruchtreife untersucht:

- Fruchtfleischfestigkeit
- Genexpression und Aktivität zellwandabbauender Enzyme
- Pektinabbau (Zellwandfraktionierung) während der Fruchtreife
- Fruchtreife (Respiration sowie Ethylenbildung) der Äpfel
- Fruchtfleischfestigkeit in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe

3. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche erfolgten in den Jahren 2007 bis 2010 am Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee (KOB). Das Fruchtmaterial stammte aus den Versuchsanlagen am KOB. Für den Großteil der Untersuchungen wurden die beiden Apfelsorten `Elstar` und `Pinova` ausgewählt. Ziel war es dabei, eine Sorte mit eher begrenzter Lagerfähigkeit und intensiverem Festigkeitsabbau während der Lagerung (`Elstar`) sowie eine lagerstabile Sorte mit geringerem Festigkeitsverlust (`Pinova`) zu untersuchen. Daneben wurden ergänzende Untersuchungen mit der Sorte `Golden Delicious` durchgeführt. Die Bestimmung des optimalen Erntetermins erfolgte in allen Versuchen anhand des Streif-Index (Streif, 1989), wobei die Messwerte Fruchtfleischfestigkeit, Gehalt an löslicher Trockensubstanz (~Zuckergehalt) und Stärkeabbau nach folgender Formel miteinander verrechnet wurden:

$$\text{Streif-Index} = \frac{\text{Fruchtfleischfestigkeit (kg/cm}^2\text{)}}{\text{Stärkeabbauwert (1 - 10) * Refraktometerwert (°Brix)}}$$

Die Stufen 1-10 zur Beurteilung des Stärkeabbauwertes beschreiben dabei eine Boniturskala bei der Durchführung des Jod-Stärke-Tests, wobei Stufe 10 den maximalen Stärkeabbau bezeichnet (siehe Kapitel. 3.1.1). Der Erntetermin wurde anhand der Mittelwerte von mindestens 24 Einzelfrüchten bestimmt. Dabei wurden die vom Kompetenzzentrum Obstbau Bodensee empfohlenen Reifefenster für die jeweiligen Sorten herangezogen (<http://www.kob-bavendorf.de>; Stand 24.10.2011). Unmittelbar nach der Ernte erfolgte das Sortieren der Äpfel per Hand in Versuchskisten. Dabei wurden Früchte, die aufgrund der Fruchtgröße, der Grundfarbe oder der Deckfarbe für die jeweilige Partie untypisch waren, aussortiert. Gelagert wurden die Früchte in der Versuchslagereinrichtung des KOB. Diese umfasst insgesamt 48 gasdichte Kunststoffbehälter zur Simulation von CA-Bedingungen, verteilt auf insgesamt vier Kühlräume. Die Hälfte der Behälter umfasst ein Lagervolumen von je 0,5 m³, die restlichen 24 Container fassen jeweils 0,25 m³. Die Kühlung der CA-Behälter erfolgt dabei als Mantelkühlung indirekt über die Kälteanlage im Kühlraum. Die Messung und Regelung der Temperatur sowie der O₂- und CO₂- Gehalte im Lager erfolgt computer-

gesteuert. Nachlagerungen, Shelf-life Versuche sowie Messungen der Ethylen- und CO₂-Produktion wurden in speziellen, temperierbaren Räumen durchgeführt.

3.1 Untersuchungen zur Fruchtreife und Fruchtqualität

Im Folgenden werden alle im Zuge der einzelnen Versuche durchgeführten Methoden genauer beschrieben. Angaben zu Hersteller und gegebenenfalls Typenbezeichnung der verwendeten Geräte und Materialien erfolgen jeweils in Klammern.

3.1.1 Untersuchungen der Fruchtqualität

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden zur Untersuchung der Qualitätsparameter je Variante und Probenahmetermin 3 Wiederholungen mit je 8 Früchten, also insgesamt 24 Äpfel verwendet. Die Fruchtfleischfestigkeit wurde in allen Versuchen gemessen. Zusätzlich erfolgten für die Bestimmung des optimalen Erntetermins (Streif-Index) Analysen zum Gehalt an löslicher Trockensubstanz sowie zum Stärkeabbau.

Die **Fruchtfleischfestigkeit** wurde mit einem halbautomatischen Penetrometer (Fa. Güss, Fruit Texture Analyzer) nach Magnus-Taylor bestimmt. Dazu wurde ein Stempel mit einer Fläche von 1 cm² 8 mm tief ins Fruchtfleisch gedrückt. Die Ergebnisse werden in kg/cm² angegeben, bzw. mit dem Faktor 9,81 in Newton (N) umgerechnet. Um repräsentative Werte zu erhalten, wurden die Messungen am Übergang zwischen Schatten- und Sonnenseite der Frucht nach Entfernung der Schale durchgeführt. Pro Frucht erfolgte jeweils eine Messung.

Die Bestimmung des **Stärkeabbaus** erfolgte mit dem Jod-Kali-Test. Dazu wurde aus der Frucht äquatorial eine Scheibe herausgeschnitten und mit Lugol'scher Lösung (10 g Kaliumjodid + 3 g Jod + 1 l destilliertes Wasser) bestrichen. Die Bestimmung des Stärkeabbaus erfolgte anhand einer Boniturskala von 1-10 (1 = kein Stärkeabbau; 10 = kompletter Stärkeabbau).

Zur Bestimmung des **Gehaltes an löslicher Trockensubstanz (TSS)**, welcher näherungsweise den Zuckergehalt angibt, wurden die Früchte mit einem Haushaltsensafter (Zentrifugal-Prinzip) entsaftet und filtriert. Die Messung des **Gehaltes an löslicher Trockensubstanz**

erfolgte mit einem digitalen Refraktometer (Atago PR1). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in °Brix.

3.1.2 Messen der CO₂-Produktion während der Shelf-Life Phasen

Zur Messung der CO₂-Produktion während der Shelf-life Phasen wurden je Variante drei Wiederholungen zu je 4 Früchten gewogen und in Gläsern (Volumen: 4,25 l) der Respirations- Messanlage eingeschlossen. Die maximale tolerierte Differenz zwischen den Varianten bei Einwaage betrug dabei 50 g. Während der Nachlagerung wurden die Gläser permanent bei definiertem Durchfluss (~14-17 l/h) mit Frischluft durchspült. Zur CO₂-Messung wurde die aus den einzelnen Gläsern ausströmende Luft über ein Infrarot CO₂-Meßgerät (URAS-2, Fa. Mannesmann) geleitet. Die Verrechnung der Ergebnisse erfolgte anschließend in ml CO₂*(kg*h)⁻¹. Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau der Respirationsmessanlage.

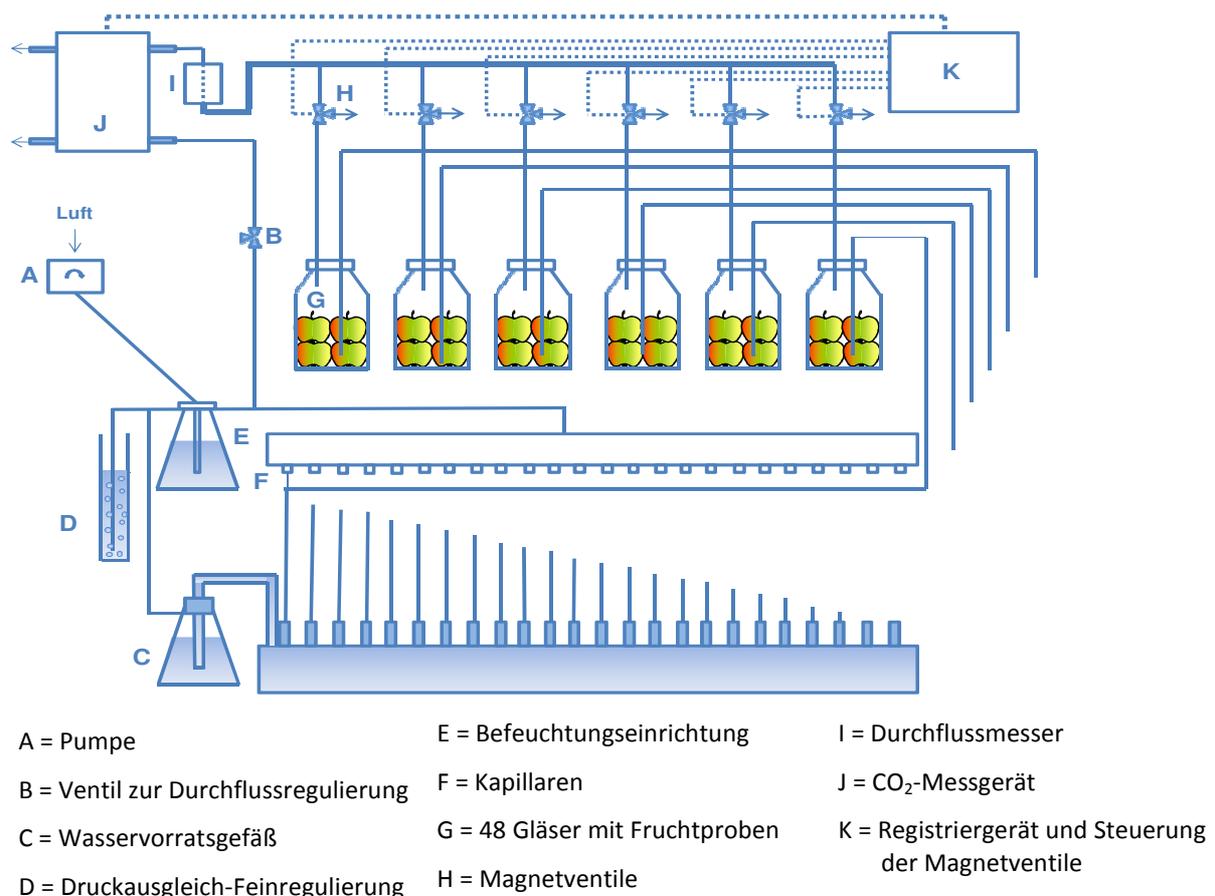


Abbildung 9: Aufbau der Respirationsmessanlage

3.1.3 Messen der Ethylenproduktion während der Shelf-life Phasen

Zur Messung der Ethylenproduktion während der Shelf-life Phasen wurden ebenfalls die Früchte in der Respirationssystemanlage verwendet. Nachdem der Durchfluss für 2 Stunden unterbrochen und die Gläser verschlossen wurden, erfolgte mit einer 10 ml Spritze die Entnahme der Proben aus dem Headspace der einzelnen Gläser. Die Ethylenkonzentration in den Proben wurde gaschromatographisch (Carlo Erba, Fractovap Series 2150) bei folgenden Messbedingungen bestimmt:

- Volumen der injizierten Probe: 1 ml
- Detektor: FID (Flammenionisationsdetektor)
- Injektor-Temperatur: 175°C
- Säule: Edelstahl, 0,9m x 1/8 Zoll; Füllung: aktiviertes Aluminiumoxid, 60 mesh
- Säulen-Temperatur: 100°C

Die Berechnung der Ethylenkonzentration erfolgte mit Hilfe eines definierten Standards in $\mu\text{l} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$.

3.1.4 Methode zu Festigkeitsmessungen in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe

Die Messungen der Gewebefestigkeit in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe erfolgten mit einem Gerät zur Werkstoffprüfung der Firma Zwick-Roell in Ulm (Zwicki-line Prüfmaschine Z 0.5). Mit dieser Methode konnten die Festigkeitseigenschaften der beiden Sorten `Elstar` und `Pinova` genauer charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den Messungen mit dem Penetrometer, bei denen ausschließlich die für das Eindringen des Messstempels maximal notwendige Kraft (F_{max}) erfasst wird, liefert diese Messmethode Informationen zur Gewebefestigkeit in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe. Dies ermöglicht zumindest annähernd eine Simulation des Beißvorgangs in die Frucht durch den Konsumenten sowie eine Analyse der dabei auftretenden Festigkeitsverhältnisse. Analog zu den Messungen mit dem Penetrometer wurden dabei ein Stempel mit einer Fläche von 1 cm² verwendet und folgende Messparameter eingestellt:

- Vorkraft: 0,5 N
- Geschwindigkeit Vorkraft: 50 mm/min
- Eindringtiefe: 8 mm

- Eindringgeschwindigkeit: 200 mm/min
- Messübertragungsrate: 100 Hz

Mit der Prüfsoftware TestXpert® wurde anschließend ein Kraft/Weg-Diagramm zu den jeweiligen Messreihen erstellt.

3.1.5 Mineralstoffanalysen

Der Mineralstoffgehalt pro Versuchsvariante wurde aus einer Mischprobe von jeweils 25 Äpfeln bestimmt. Nach dem Waschen der Früchte in H₂O + Tween®21 (Sigma-Aldrich) wurde aus den Äpfeln äquatorial eine Scheibe herausgeschnitten, von der wiederum ein Teil der Schatten- sowie ein Teil der Sonnenseite für die Durchführung der Analysen verwendet wurden. Das Fruchtmaterial wurde zunächst in einer Messermühle (GRINDOMIX GM 200, Fa. Retsch) homogenisiert, etwa 100 g Frischsubstanz eingewogen, anschließend gefriergetrocknet, nach dem Trocknen erneut gewogen und bis zur Durchführung der Analysen in einem Exsikkator trocken gehalten. Zur Bestimmung des Gehaltes an Kalium, Calcium Magnesium und Phosphor wurde 1-1,5 g des Fruchtpulvers eingewogen und bei 480 °C während 6 h im Muffelofen verascht. Der Aufschluss der Asche erfolgte mit 2 ml 20%-tiger Salzsäure und Überführung mit destilliertem Wasser in einen 100 ml Messkolben. Um störende Einflüsse durch P bei den Calcium-Messungen zu vermeiden, wurde jeder Aschelösung 0,001 M Lanthan zugegeben. Die Bestimmung des Ca-, K- und Mg-Gehaltes erfolgte mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Fa. GBC, Gerätetyp 908). Der P-Gehalt der Proben wurde mit einem Spektralphotometer kolorimetrisch mit der Molybdän-Blau-Methode nachgewiesen. Die Mineralstoffkonzentrationen werden in mg/100 g Frischsubstanz angegeben.

3.2 Biochemische sowie molekulargenetische Methoden

3.2.1 Probenaufbereitung

Weiterführende Untersuchungen erfolgten anhand einer Mischprobe des Fruchtfleisches von 8-10 Einzelfrüchten je Wiederholung. Dazu wurde eine Scheibe aus der äquatorialen Ebene der Äpfel entnommen, die Schale entfernt, das Fruchtfleisch mit dem Messer zerkleinert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Gefriertrocknung (Pio-K-E-W, Fa. Piatkowski) bei -40°C aufbewahrt. Nach ca. einer Woche Gefriertrocknung wurde das

Fruchtmaterial in Kunststoffbeuteln luftdicht verpackt, sodann fein gemahlen und bis zur Durchführung der Analysen wieder bei -40°C gelagert.

3.2.2 Gewinnung des Zellwandmaterials und Zellwandfraktionierung

Die Zellwandfraktionierung erfolgte in Anlehnung an Regwell et al. (1992) mit einigen Änderungen. Das Zellwandmaterial der Äpfel wurde als alkoholunlöslicher Rückstand isoliert. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Extraktion des Zellwand-Materials in eine wasserlösliche, eine komplexbildner-lösliche sowie eine in Natriumcarbonat lösliche Pektinfraktion. Im Anschluss an die Extraktionsschritte wurden die jeweiligen Fraktionen in destilliertem Wasser auf einem Magnetrührer für 2 Tage mit Hilfe von Dialysemembranen (Spectra/Por® Dialysis Membrane, MWCO: 6-8,000) dialysiert, um die Fraktion zu reinigen und Ionen des Extraktionspuffers zu entfernen. Während der Dialyse wurde 2 bis 3-mal täglich die Dialyselösung (bidest. H₂O) gewechselt. Alle Zentrifugier-Schritte erfolgten bei 4°C und 4000 g (14000 upm) für 50 min.

3.2.2.1 Extraktion des alkoholunlöslichen Zellwandmaterials

Zur Extraktion des Zellwandmaterials wurden 3 g gefriergetrocknetes Material in 15 ml **PAW** (phenol : acetic acid : water; 2:1:1 (w/v/v)) gegeben, 2 min auf dem Vortex und während 15 min auf dem Probenschüttler homogenisiert, anschließend zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und gesammelt (Überstand 1). Danach wurden der Rückstand erneut in 15 ml destilliertem Wasser resuspendiert und die vorherigen Schritte wiederholt. Die Überstände aus beiden Schritten wurden zusammen gegeben, für 2 Tage dialysiert und erneut zentrifugiert, um eventuelle Fällungsprodukte aus der Dialyse zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend gefriergetrocknet und gewogen. Die PAW-lösliche Fraktion repräsentiert Pektine, die bereits während der Fruchtreife *in vivo* gelöst wurden.

Das alkoholunlösliche Zellwandmaterial (AIR = alcohol insoluble residue) aus dem Extraktionsschritt wurde mit Aceton gewaschen, vakuumfiltriert, gefriergetrocknet und ebenfalls gewogen. Die Gehalte an PAW-löslichem Pektin sowie alkoholunlöslichem Zellwandmaterial wurden bezogen auf das Gewicht in mg/g Trockensubstanz umgerechnet.

3.2.2.2 Extraktion der Pektinfraktionen

100 mg gefriergetrocknetes Zellwandmaterial wurde während 2 h bei 20°C in 20ml destilliertem H₂O homogenisiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand abpipettiert (Schritt 1). Nach anschließender Dialyse wurde die Fraktion durch MiraCloth (Calbiochem, Darmstadt) filtriert, gefriergetrocknet und gewogen. Die H₂O-lösliche Fraktion besteht ebenfalls aus Pektinen, die bereits während der Fruchtreife *in vivo* gelöst wurden.

Der Rückstand aus Schritt 1 wurde in 20 ml 0,05M CDTA (1,2-Diamino-cyclohexan-N,N,N',N'-tetraacetat) während 6 h bei 20°C geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Rückstand wurde in 10 ml destilliertem H₂O resuspendiert, 5 min bei 20°C geschüttelt und erneut zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden zusammen gegeben, dialysiert, mit MiraCloth filtriert, gefriergetrocknet und gewogen. Die CDTA-lösliche Fraktion enthält ionisch, durch Ca²⁺-Brücken gebundene Pektine aus der Mittellamelle.

Der Rückstand wurde in 20ml 0,05M Na₂CO₃ über Nacht (16 h) bei 4°C geschüttelt. Na₂CO₃ extrahiert kovalent gebundene, hoch verzweigte RG1 (Rhamnogalacturonan), also fest an die Zellwand gebundene Pektine. Wie bei der CDTA-Extraktion wurde auch hier der Rückstand in einem zweiten Schritt mit destilliertem H₂O resuspendiert und die beiden Überstände (Na₂CO₃ und H₂O) zusammen gegeben. Vor der Dialyse wurde mit konzentrierter Essigsäure (99-100 %) in der Fraktion ein pH-Wert von 5,0 eingestellt. Nach anschließender Dialyse wurde der Überstand filtert und gewogen.

Die Ergebnisse für die H₂O-, CDTA- sowie Na₂CO₃-löslichen Fraktionen wurden bezogen auf die eingewogene Menge an Zellwandmaterial in mg/100mg Zellwandmaterial (ZWM) angegeben. Der Ablauf der einzelnen Extraktionsschritte ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

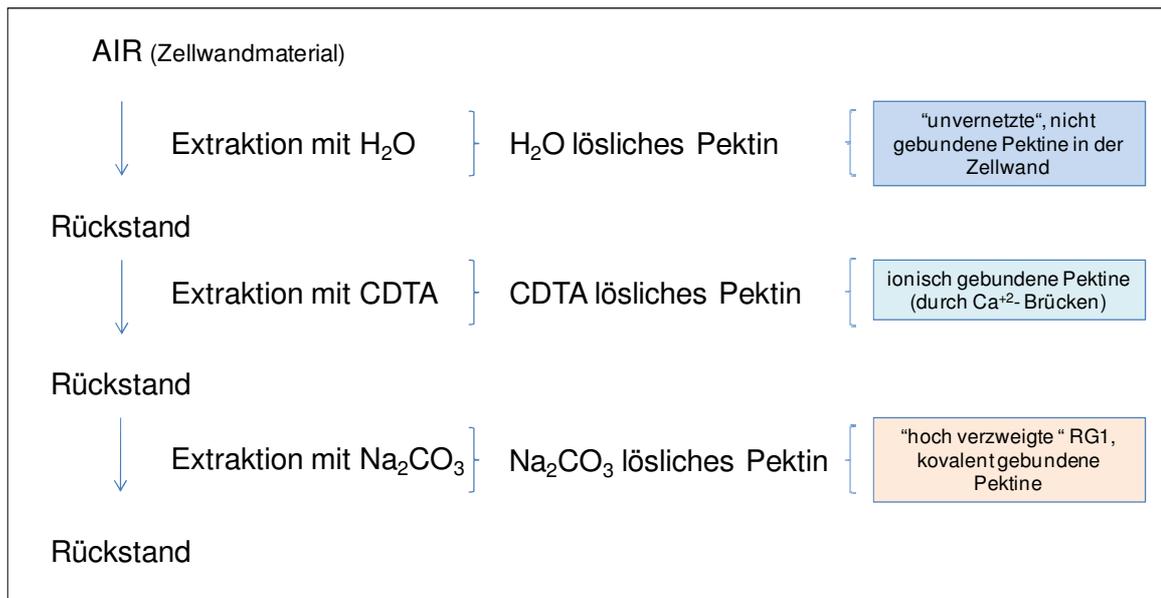


Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Extraktion der Pektinfraktionen aus alkoholunlöslichem Zellwandmaterial (AIR = alcohol insoluble residue) (nach Crouch und Huysamer, 2010).

3.2.3 Methoden zur Bestimmung der Genexpression

Die Untersuchungen zur Genexpression zellwandabbauender Enzyme erfolgten zum einen durch die Firma NSure in den Niederlanden, zum anderen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pflanzen-Biotechnologie der Universität Freiburg durch Gastwissenschaftler aus Palästina, Dr. Jamil Harb und Omar Saleh. Die Untersuchungen wurden bei NSure mit gefriergetrocknetem Material, an der Universität Freiburg mit in flüssigem N_2 gefrorenem Probenmaterial durchgeführt. Im Folgenden werden zur Vereinfachung die Analysen der Firma NSure mit (I) und die Untersuchungen an der Universität Freiburg mit (II) bezeichnet.

3.2.3.1 Bestimmung der Genexpression zellwandabbauender Enzyme (I)

Um zu testen, ob die RNA des Probenmaterials während des Trocknungsvorganges stabil geblieben war, wurde RNA aus dem Fruchtmaterial isoliert und mittels Gel-Elektrophorese sowie quantitativer PCR analysiert. Dabei wurden die ribosomale RNA sowie ein mRNA Gen untersucht.

Zur anschließenden Isolierung und Vorbereitung der RNA wurde 0,5 g getrocknetes Material verwendet. Die Isolierung der RNA erfolgte anhand einer veränderten CTAB Methode nach Sambrook et al (2000). Die RNA wurde mit Hilfe des RNA Cleanup Protokolls von Qiagen

(Nr. 74104) gesäubert. Nach Behandlung der RNA mit 2U SIGMA DNase wurden 0,5µg RNA mit einem iScript Synthesis Kit von Bio-Rad (Nr. 170-8890) in cDNA umgesetzt. Anschließend erfolgte eine RT-PCR mit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Nr. 170-8882) 10 s bei 95°C und 20 s bei 55°C auf einem MyiQ terminal Cyler. Die mRNA- Expressionswerte wurden mit Hilfe der 2-ΔCT Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001), wobei β-Aktin als endogene Referenz verwendet wurde.

Tabelle 1: Umrechnungsfaktoren zur späteren vergleichenden graphischen Darstellung der normalisierten Werte der Genexpressionsanalysen.

Enzym/ Gen	Multiplikationsfaktor
Polygalacturonase	$\times 10^{-1}$
Endoglucanase	$\times 10$
Pectatlyase	$\times 10^3$
β-Xylosidase	$\times 1$
β-Galactosidase	$\times 10^{-1}$
Pectinmethylesterase	$\times 10^4$

Die Ergebnisse wurden als normalisierte Expression ausgedrückt. Zur vergleichenden Darstellung in den Graphiken erfolgte die Umrechnung der Expression in relative Werte anhand der in Tabelle 1 dargestellten Faktoren. Tabelle 2 zeigt Accession-Nummern sowie Primersequenzen der entsprechenden Gene.

Tabelle 2: Accession-Nummern und Primersequenzen der analysierten Gene (I) zellwandabbauender Enzyme.

Gen	Accession Number	Forward	Reverse
Pectatlyase	AY376878.1	CATGACGCACCATGATAAGG	TGATTGAACGCAATGGTGAT
Endo β-1,4-Glucanase	EB153493	ATGTCCTCTATGGCGAGGTG	CTTGTAAGCCTGGCGGTTAG
Pectinmethylesterase	Mdltx7526A12.g1	TAAATGTCGAGGTCGGGAAG	TAAACCCATCACCAACAGCA
β-Xylosidase	AB007121.1	TGCTGATGTTCTATTCGGCACTACA	ACACAACCTGGGCCCTTGAAAAATCT
Polygalacturonase	51507672	CTCGAGCTCGGTTATAGGAACAGGT	TCCCAAGCTACCAATACTGATTCCA
β-Galactosidase	51507376	GTCAGGGTGAAATGGACATACAAG	TGGTCCTTCTACCCATTCAACAGAA
rRNA	GU198997	TGACGGAGAATTAGGGTTCG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
Actin	GQ339778	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

3.2.3.2 Bestimmung der Genexpression zellwandabbauender Enzyme (II)

RNA Extraktion: Die RNA Extraktion erfolgte nach Chang et al. (1993) mit einigen Veränderungen. 20 ml eines vorgewärmten (65°C) und mit 2-Mercaptoethanol-behandelten (2 % v/v) CTAB Puffers wurden zu 8 g in flüssigem N₂ gefrorenem, gemahlenem Fruchtgewebe (ohne Schale) hinzugegeben. Nach dem Mischen wurden die Proben bei 65°C für 10 min inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min bei 8000 upm zentrifugiert. Anschließend wurde die entsprechende Menge Chloroform : Isoamylalcohol (24:1) zweimal zum Überstand hinzugegeben und während 20 min erneut bei 8000 upm zentrifugiert, bevor die RNA mit 5 M LiCl über Nacht bei 4°C ausgefällt wurde. Nach anschließendem Zentrifugieren (8000 upm) bei 4°C für 60 min wurde der Niederschlag zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, für 10 min zentrifugiert und bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet. Der Niederschlag wurde in RNase-freiem H₂O erneut gelöst, für 5 min auf 65°C erhitzt und auf dem Vortex geschüttelt um die RNA zu lösen. Zum Schluss wurden die unlöslichen Partikel bei 13000 upm und 4°C während 10 min abzentrifugiert. Quantität und Qualität der RNA wurden photometrisch und durch Gelelektrophorese (1% Agarose-Gel) bestimmt. Die RNA wurde anschließend mit einem RNeasy® MinElute® Cleanup Kit (Qiagen) aufgereinigt und der DNase-Behandlung mittels RNase-Free DNase Set (Qiagen) unterzogen.

qPCR Analyse: Die cDNA wurde aus 2µg DNA-verdauter RNA mit Hilfe eines TaqMan reverse transcription reagents kit (Applied Biosystems) entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit random-Hexamer-Primern synthetisiert. Das PCR Programm erfolgte dabei wie folgt: 10 min bei 25 °C, 1 h bei 48 °C und 5 min bei 95 °C. Um die quantitativen Veränderungen in der Expression der ausgewählten Gene zu erfassen, wurden Gen spezifische Primer entworfen (Tabelle 3), basierend auf Sequenzen aus der NCBI Datenbank. Pro Variante wurden zwei biologische mit jeweils drei technischen Wiederholungen verwendet. Jede technische Wiederholung erfolgte mit 50 ng cDNA. Anschließende qRT-PCRs wurden mit einem SensiMix kit (Bioline) an einem LightCycler 480II (Roche, Applied Science, Penzberg) ausgeführt. Folgendes Programm wurde dabei gefahren: 10 min bei 95 °C (hot start), 15 sec bei 95°C, 1 min bei 60 °C und 20 sek bei 72 °C (Amplifikationszyklen = 40), dann 5 min bei

95°C, anschließend 1 min bei 65 °C. Danach wurde die Temperatur auf 95 °C erhöht (melting step). Im letzten Schritt wurde auf 40°C während 30 sec gekühlt.

Die Expressionslevel der untersuchten Gene wurden bezogen auf die Transkriptionsabundanz des Referenz-Gens 18S nach Livak und Schmittgen (2001) berechnet.

Tabelle 3: Gen spezifische Primer zur Bestimmung der Genexpression zellwandabbauender Enzyme

Gen	Accession Number	Forward	Reverse
Md-AFase1	AY309436.1	GAATCGAGCGATGTCATCAGGACT	CGACTGACCACATACTACATGCCA
Md β-GS	L29451	TCAACTCTGCCACTCTCTCTGT	TCCCTTGCTTCTGAAACGCTCA
MdEXP2	AY083167	AGCACTTTGATTTGGCTGAGCCTG	TCCCTTCTTACACACGAAACCCT
MdXTH10	EU494969	CAATCCCCAAGAAGCTGAAAGACTG	TCTGCTCCGGTGGTGATGCTT
MdXTH2	EU494961	TCAGGCACTCCCGTTGTCCTT	GCCCTGTGGAATCGAGTGACTGA
MdPG	L27743.1	GGAATTGATCAGGCCAAGAA	GCTCCACTGGAAGAACAAGC
Md-PL	Y376878.1	ACCTCGCTTTGTTTCTCTGAGGCT	GTCAACACTTCAACTTGTCTTCTC
18S*	GU198997	CGGAGAGGGAGCCTGAGAA	CCCGTGTTAGGATTGGGTAATTT

3.3 Methodenentwicklung zur Bestimmung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit bestand darin, Methoden zur Bestimmung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme zu prüfen und entsprechend zu optimieren. Zur Durchführung der enzymatischen Untersuchungen wurden zunächst 100 mg gefriergetrocknetes, gemahlene Fruchtmaterial verwendet. Die Enzymextraktion erfolgte mit entsprechendem Puffer nach Lohani et al. (2004). Die Ergebnisse wurden anfangs bezogen auf den Gesamtgehalt an Protein im Extrakt als spezifische Aktivität ausgedrückt. Die Bestimmung des Proteingehaltes im Extrakt erfolgte nach Bradford (1976) mit Hilfe des Protein Assay Kits von Bio-Rad (München). Dabei wurden 900 µl des entsprechenden Puffers, 100 µl Enzymextrakt sowie 200 µl Enzym-Assay-Reagenz in Einmalküvetten für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte photometrisch die Bestimmung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Standard diente BSA (*bovine serum albumin*) von Bio-Rad. Der Gehalt an Gesamtprotein im Enzymextrakt wurde in mg pro Menge eingewogenem Fruchtmaterial (~100 mg Trockensubstanz) angegeben.

Die Aktivität der **Pektinmethylesterase** (PME) wurde zunächst nach Hagermann und Austin (1986) mit leichten Veränderungen bestimmt, wobei eine 0,5%-ige Pektinlösung (w/v) als Substrat diente. Die Bestimmung der **β -Galactosidase**-Aktivität (β -Gal) erfolgte nach Vicente et. al. (2005). Die Ergebnisse wurden als μg freies p-Nitrophenol*(mg Protein*h)⁻¹ bei einer Wellenlänge von 410 nm erfasst. Die Bestimmung der **Polygalacturonase**-Aktivität (PG) wurde nach Pathak und Sanwall (1998) durchgeführt. Als Substrat diente dabei eine 1%-ige (w/v) Pektin-Lösung (Sigma-Aldrich) mit pH 4,5. Die Ergebnisse wurden als Menge an freigewordener Galacturonsäure [μg]*(mg Protein*h)⁻¹ angegeben. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die als Polygalacturonase-Aktivität bestimmten Werte 1-MCP-behandelter sowie unbehandelter Äpfel der Sorte `Pinova` während 10 Wochen Lagerung bei 10°C.

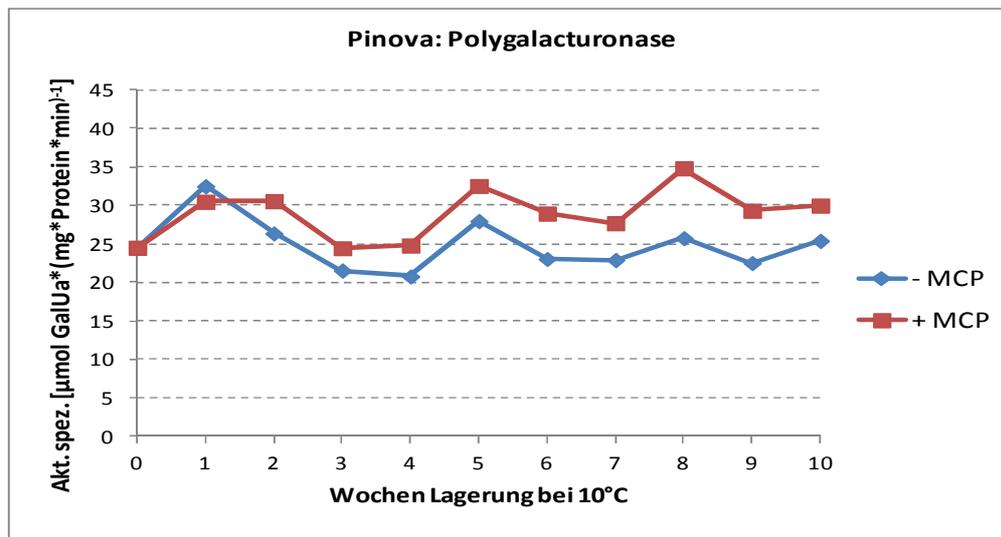


Abbildung 11: Ergebnisse nach der ursprünglichen Methode zur Bestimmung der Polygalacturonase-Aktivität: spezifische Enzymaktivität bei `Pinova` während 10 Wochen bei 10°C.

Überraschenderweise zeigten sich zu Beginn in den Analysen an den mit 1-MCP behandelten Früchten in einem Großteil der durchgeführten enzymatischen Messungen stets höhere Enzymaktivitäten als an den Kontrollfrüchten, obwohl auf Grund des verbesserten Erhalts der Fruchtfleischfestigkeit an diesen Früchten sowie aufgrund von Angaben aus der Literatur (z.B. Jeong und Huber, 2004; Wei et al., 2010) eine Hemmung der Enzymaktivitäten zu erwarten gewesen wäre.

Um die Richtigkeit dieser Ergebnisse zu überprüfen wurde versucht, das Vorhandensein eventueller Störfaktoren zu untersuchen und diese gegebenenfalls zu identifizieren bzw. zu eliminieren.

3.3.1 Nachweis von Störfaktoren durch Proteinaufreinigung mittels Ultra-Filtration

Zur Trennung der Proteine im Extrakt von eventuellen Störgrößen erfolgte vor dem Messen der Enzymaktivität zunächst eine Ultra-Filtration des Extrakts mit Hilfe von Zentrifugenfiltern (Amicon Ultra-0.5, Millipore). Die molekulare Trenngrenze (MWCO) der Filtrationsmembrane betrug dabei 10000. In Abbildung 12 werden die einzelnen Schritte schematisch dargestellt. Zunächst wurden 500 μ l vom Enzymextrakt in den Zentrifugenfilter-Einsatz pipettiert. Nach 30 min zentrifugieren bei 13000 upm erfolgte die Rückgewinnung des Proteins durch Herausnehmen des Filtereinsatzes, Wenden, Einsetzen in ein sauberes Zentrifugenröhrchen sowie erneutes Zentrifugieren während 2 min bei 1500 upm. Das Proteinkonzentrat wurde anschließend mit entsprechendem Reaktionspuffer wieder auf das anfängliche Volumen von 500 μ l aufgefüllt. Die Messung der Enzymaktivität am Beispiel der Polygalacturonase sowie die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Protein im Extrakt erfolgten sowohl im Proteinkonzentrat als auch im Protein-freien Filtrat. Parallel dazu wurden die Analysen mit identischem Fruchtmaterial ohne vorherige Protein-Aufreinigung durchgeführt.

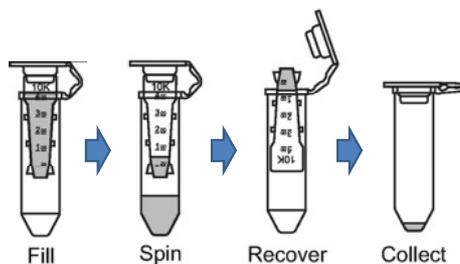


Abbildung 12: Schematischer Ablauf der Protein-Aufreinigung mit Zentrifugenfiltern (Quelle: www.millipore.com; Stand: 24.10.2011)

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Polygalacturonase-Aktivität bezogen auf das Trockengewicht der Einwaage im proteinfreien Filtrat, im Proteinkonzentrat sowie im Standard-Enzymextrakt. Die gemessene Enzymaktivität war im Filtrat vergleichbar mit der Messung im Standard-Enzymextrakt und damit deutlich höher als im Proteinkonzentrat.

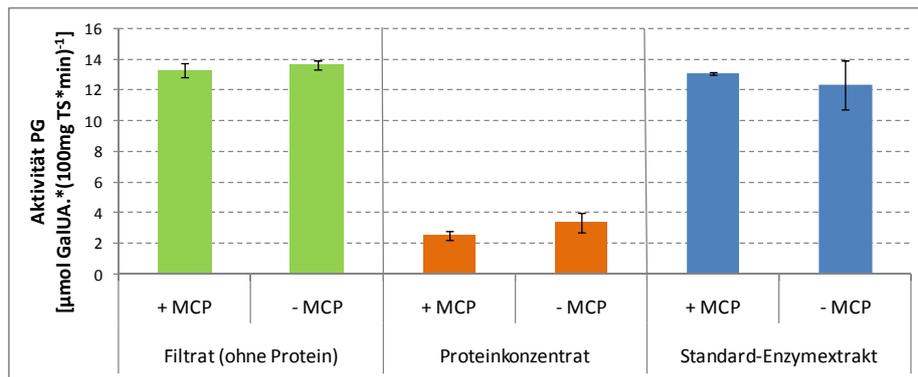


Abbildung 13: PG-Aktivität im Filtrat, Proteinkonzentrat sowie im Standard-Enzymextrakt; die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

In Abbildung 14 wird der gemessene Gesamtproteingehalt im Filtrat, Proteinkonzentrat und im Standard-Extrakt dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass zwar auch im Filtrat eine Restmenge an Protein zu finden war, der Großteil an gemessenem Protein jedoch, wie zu erwarten, im Proteinkonzentrat vorlag. Im Standard-Extrakt war der Gehalt insgesamt am höchsten.

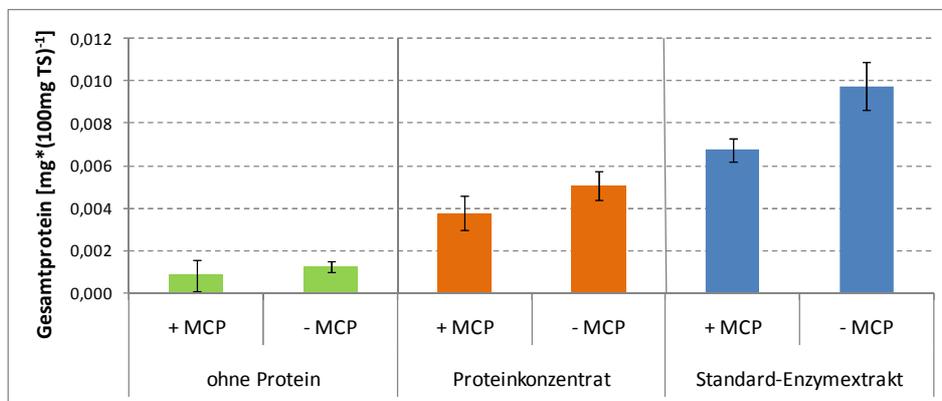


Abbildung 14: Menge an Gesamtprotein im Filtrat, Proteinkonzentrat sowie im Standard-Enzymextrakt; die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

Abbildung 15 zeigt die berechnete spezifische PG-Aktivität bezogen auf die Menge an Protein im Extrakt. Hierbei wird deutlich, dass vor allem im überwiegend Protein-freien Filtrat hohe Werte an spezifischer Aktivität gemessen wurden. Dies zeigt, dass sich im Enzymextrakt Störfaktoren befinden, welche die Farbreaktion und folglich photometrische

Messung beeinflussen und dementsprechend fälschlicherweise als Enzymaktivität interpretiert werden. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um Monosaccharide im Enzymextrakt handelt, wurden weitere Untersuchungen mittels Gelfiltration durchgeführt.

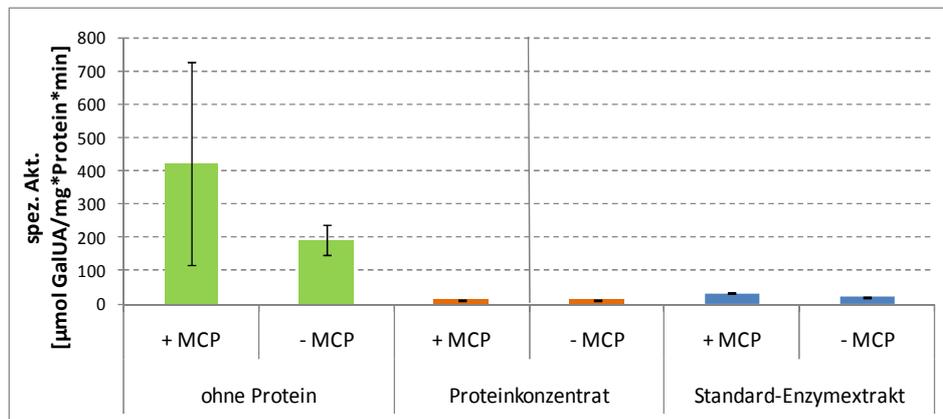


Abbildung 15: Spezifische PG-Aktivität im Filtrat, Proteinkonzentrat sowie im Standard-Enzymextrakt; die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

3.3.2 Nachweis des Einflusses von Monosacchariden mittels Gelfiltration

Zum Überprüfen der Hypothese, dass freie, im Enzymextrakt bereits vorhandene Monosaccharide die Ergebnisse der photometrischen Messungen beeinflussen und somit deren Gehalt fälschlicherweise als Enzymaktivität interpretiert wird, erfolgte eine Fraktionierung des Enzymextraktes mit Hilfe von Sephadex-Gelfiltrations-Säulen (PD-10 Desalting Column, GE Healthcare). Das Verfahren funktioniert nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie, wobei Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Monosaccharide, können in die Poren des Gels eindringen und laufen dementsprechend langsamer durch die Säule als höher molekulare Verbindungen. Die jeweilige Porosität des Gels bestimmt dabei den Fraktionierungsbereich des Typs (Determann, 1967). Das Kalibrieren der Säulen erfolgte zunächst mit BSA (*bovine serum albumin*) in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1% und 1%). Zuvor wurden die Säulen mit 25 ml des entsprechenden Puffers equilibriert. Nach dem Auftragen auf die Säule wurde der BSA Standard erneut mit entsprechendem Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen und anschließend Proteingehalt, Enzymaktivität am Beispiel der

Polygalacturonase, sowie der Gehalt an verschiedenen Monosacchariden in den einzelnen Fraktionen mittels Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC) bei folgenden Bedingungen bestimmt:

- Detektor: Electrochemical Detector ED 40 (Dionex)
- Pumpe: Gradient Pump GP 40 Dionex (isokratisch mit 1,0 ml/min Flow)
- Säulen:
 - Vorsäulen: (1) Borate Trap™; 4 x 50 mm, Trap Column (Dionex)
 - (2) CarboPac™ PA – 100; 4 x 50 mm, Guard (Dionex)
 - Hauptsäule: (3) CarboPac™ PA – 100; 4 x 250 mm, Analytical (Dionex)
- Laufmittel: 100 mM NaOH
- Laufzeit: Insgesamt 25 min (nur die ersten 15 min wurden aufgezeichnet)

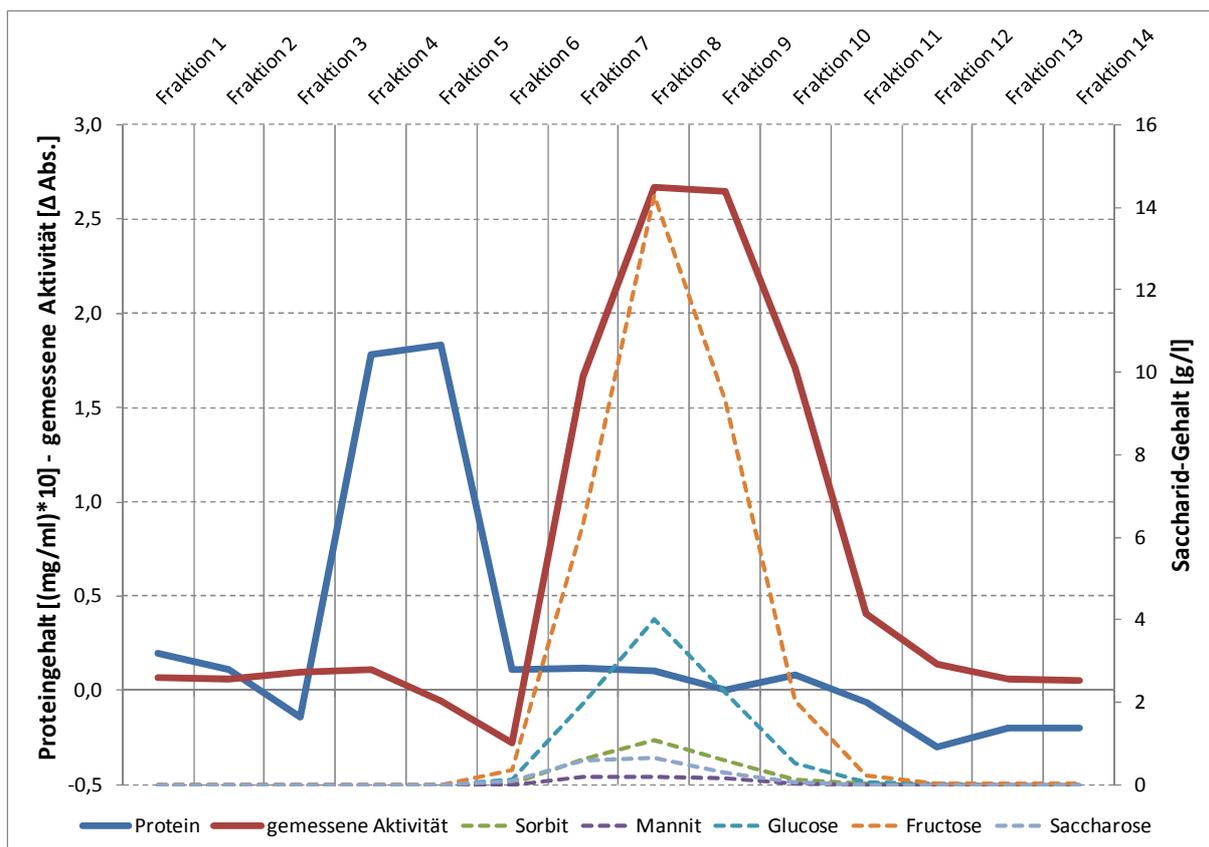


Abbildung 16: Gesamtproteingehalt (nach Bradford), gemessene Enzymaktivität (in vitro) sowie Gesamtgehalt an Sorbit, Mannit, Glucose, Fructose und Saccharose in den mittels Gelfiltration aufgetrennten 1ml-Fractionen.

Abbildung 16 zeigt den Gesamtproteingehalt, den Gehalt an einzelnen Sacchariden sowie die mit der Methode zur Bestimmung der Polygalacturonase-Aktivität erfasste Änderung der Absorbanz (Δ Abs.) in den aufgetrennten 1 ml Fraktionen. Dabei wird deutlich, dass vor allem in den monosaccharid-haltigen Fraktionen photometrisch eine deutliche Erhöhung der Absorbanz gemessen werden konnte, kaum jedoch in den proteinhaltigen Fraktionen.

In einer anschließenden Korrelationsanalyse wurde der statistische Zusammenhang zwischen als PG-Aktivität gemessener Absorbanz und dem Gesamtproteingehalt bzw. Gehalt des jeweiligen Saccharids in den Fraktionen bestimmt. Der Test auf Signifikanz erfolgte dabei tabellarisch anhand der Zufallshöchstwerte des Korrelationskoeffizienten bei einseitigem Test. Wie Tabelle 4 zeigt, konnte zwischen der mit der ursprünglichen Polygalacturonase-Methode bestimmten Absorbanz [Δ Abs.] und den einzelnen Sacchariden ein hochsignifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Tabelle 5 hingegen zeigt, dass zwischen Proteingehalt und gemessener Enzymaktivität kein Zusammenhang bestand. Dies bestätigt eindeutig die These, dass Veränderungen vor allem im Gehalt an Monosacchariden zu einer fälschlichen Interpretation der Enzymaktivitäten führen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden in weiteren Schritten die Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität angepasst und ein Schritt zur Aufreinigung des Proteinextraktes bzw. zur Eliminierung von Monosacchariden im Extrakt integriert.

Tabelle 4: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen Saccharid-Gehalt und gemessener Δ Absorbanz (Polygalacturonase Methode nach Pathak und Sanwall (1998)) in den einzelnen Fraktionen; $\alpha\% = 0,1$.

Korrelation zwischen Saccharid-Gehalt [g/l] und gemessener Δ Absorbanz																
Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Korrel.-Koeff.	Signifikanz
Δ Absorbanz	0,07	0,06	0,10	0,11	-0,05	-0,28	1,67	2,67	2,64	1,71	0,40	0,14	0,06	0,06	0,89	**
Sorbit	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,62	1,07	0,59	0,13	0,01	0,00	0,00	0,00		
Δ Absorbanz	0,07	0,06	0,10	0,11	-0,05	-0,28	1,67	2,67	2,64	1,71	0,40	0,14	0,06	0,06	0,88	**
Mannitol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,20	0,19	0,17	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00		
Δ Absorbanz	0,07	0,06	0,10	0,11	-0,05	-0,28	1,67	2,67	2,64	1,71	0,40	0,14	0,06	0,06	0,90	**
Glucose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	1,97	4,00	2,24	0,51	0,05	0,01	0,00	0,00		
Δ Absorbanz	0,07	0,06	0,10	0,11	-0,05	-0,28	1,67	2,67	2,64	1,71	0,40	0,14	0,06	0,06	0,92	**
Fructose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	6,33	14,27	9,29	2,05	0,21	0,02	0,01	0,01		
Δ Absorbanz	0,07	0,06	0,10	0,11	-0,05	-0,28	1,67	2,67	2,64	1,71	0,40	0,14	0,06	0,06	0,79	**
Saccharose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,60	0,66	0,27	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00		

Tabelle 5: Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen Gesamtprotein-Gehalt und gemessener Δ Absorbanz (Polygalacturonsase Methode nach Pathak und Sanwall (1998)) in den einzelnen Fraktionen; $\alpha\%=0,1$.

Korrelation zwischen Gesamtproteingehalt [(mg/ml)*10] und gemessener Δ Absorbanz															Korrel.-Koeff.	Signifikanz
Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Proteingehalt	0,20	0,11	-0,14	1,78	1,83	0,11	0,12	0,10	0,00	0,08	-0,06	-0,30	-0,20	-0,20	-0,14	n.s.
Sorbit	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,62	1,07	0,59	0,13	0,01	0,00	0,00	0,00		
Proteingehalt	0,20	0,11	-0,14	1,78	1,83	0,11	0,12	0,10	0,00	0,08	-0,06	-0,30	-0,20	-0,20	-0,14	n.s.
Mannitol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,20	0,19	0,17	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00		
Proteingehalt	0,20	0,11	-0,14	1,78	1,83	0,11	0,12	0,10	0,00	0,08	-0,06	-0,30	-0,20	-0,20	-0,14	n.s.
Glucose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	1,97	4,00	2,24	0,51	0,05	0,01	0,00	0,00		
Proteingehalt	0,20	0,11	-0,14	1,78	1,83	0,11	0,12	0,10	0,00	0,08	-0,06	-0,30	-0,20	-0,20	-0,14	n.s.
Fructose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	6,33	14,27	9,29	2,05	0,21	0,02	0,01	0,01		
Proteingehalt	0,20	0,11	-0,14	1,78	1,83	0,11	0,12	0,10	0,00	0,08	-0,06	-0,30	-0,20	-0,20	-0,13	n.s.
Saccharose	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,60	0,66	0,27	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00		

3.3.3 Bestimmung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme

3.3.5.1 Erstellen des Enzymextrakts

Da während der späteren Proteinaufreinigung mittels Gelfiltration eine Verdünnung der Enzymkonzentration im Extrakt erfolgt, wurde die Menge an Extraktionspuffer auf 500 μ l je Extraktionsschritt reduziert, um eine ausreichende Proteinkonzentration zu gewährleisten. Die Menge an gefriergetrocknetem Fruchtmaterial betrug nach wie vor 100 mg. Nach 2 min Homogenisieren der Proben (Vortex) wurden diese 20 min in Eis auf den Probenschüttler gegeben, danach 45 min bei 4°C und 13000 upm zentrifugiert und der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Der Extraktionsschritt wurde anschließend in gleicher Weise zweimal wiederholt. Die Überstände aus den drei Extraktionen wurden gemischt, auf Eis gesetzt und für weitere Schritte als Enzymextrakt verwendet.

3.3.5.2 Enzym-Aufreinigung mittels Gelfiltration

Die Eliminierung der Monosaccharide und damit Aufreinigung des Enzymextrakts erfolgte wie in den Vorversuchen mit Hilfe von Sephadex-Gelfiltrations-Säulen (PD-10 Desalting Column, GE Healthcare, siehe Kapitel 3.3.2). Dazu wurden die Säulen zunächst mit 25 ml des entsprechenden Reaktionspuffers, der später für die Messung der Enzymaktivität verwendet wurde, equilibriert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde 1 ml des

entsprechenden Enzymextraktes auf die Säule gegeben und gewartet, bis die Probe vollständig in die Säule eingedrungen war. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml des entsprechenden Puffers auf die Säule. Das Filtrat wurde wiederum verworfen. Im Anschluss daran wurden erneut 2 ml des Reaktionspuffers auf die Säule gegeben, das Filtrat in 2ml Zentrifugen-Röhrchen (Eppendorf) aufgefangen, in Eis gesteckt und für die weitere Messung der Enzymaktivität verwendet. Die Reinigung der Säule erfolgte durch mehrmaliges Spülen mit 10-15 ml 0.2 M NaCl Lösung.

3.3.5.3 Messen der β -Galactosidase-Aktivität

Zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität diente 4-Nitrophenyl β -D-Galactopyranosid (PNP-Gal) (Sigma-Aldrich) als Substrat. 600 μ l 10 mM PNP-Gal-Lösung (pH 4,5) wurden mit 700 μ l Enzymextrakt in ein Reagenzglas gegeben. In der Nullprobe wurde der Enzymextrakt durch 50 mM Acetat-Puffer (pH 4,5) ersetzt, da zuvor in Tests bezüglich der Ergebnisse kein Unterschied zwischen abgekochtem Extrakt (zur Inaktivierung der Enzyme) und Reaktionspuffer in der Nullprobe festgestellt werden konnte. Nach 45 min Inkubation bei 40°C wurden 300 μ l der Probe in 1000 μ l 0.4 M Na_2CO_3 gegeben. Da die Farbe von p-Nitrophenol, dem Endprodukt der enzymatischen Reaktion, bei einem pH-Wert zwischen 5,4 und 6,6 von farblos in gelb umschlägt, dient die Intensität der Gelbfärbung als Indikator für die Aktivität des Enzyms. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde photometrisch in Küvetten (Plastibrand, 1,5ml halbmicro, PMMA) bei einer Wellenlänge von 410 nm durchgeführt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte anhand einer zuvor erstellten Standardkurve als freies p-Nitrophenol*(100 mg Trockensubstanz*h)⁻¹.

3.3.5.4 Messen der Pektinmethylesterase-Aktivität

Zur Bestimmung der Pektinmethylesterase (PME)-Aktivität wurde Apfel-Pektin (Sigma-Adrich) (0,5%, w/v, pH 7,5) als Substrat verwendet. 800 μ l Pektinlösung, 200 μ l 0,01% (w/v) Bromothymolblau (Fluka) sowie 100 μ l Enzymextrakt wurden in eine Küvette (Plastibrand) gegeben, durch vorsichtiges Wenden homogenisiert und anschließend während 5 h bei 28°C inkubiert. Bromothymolblau verfärbt sich bei einem pH-Wert zwischen 6 und 7,6. Bei pH < 6 nimmt es gelbe Farbe, bei pH > 7,6 blaue Farbe an. Durch die Abspaltung der Methyl-

estergruppen am Pektinmolekül infolge der PME-Aktivität (siehe Kapitel 2.4.3.4) kommt es zur pH-Wert Erniedrigung im Enzymextrakt und somit zu einer Gelbfärbung der Probe. Die Bestimmung der PME-Aktivität wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm durchgeführt. Da die gemessene Aktivität auf den Veränderungen des pH-Wertes durch die PME-Aktivität beruht, erfolgt die Darstellung der Ergebnisse nicht als Menge des entsprechenden Endproduktes der enzymatischen Reaktion sondern als $\Delta \text{Absorbanz} \cdot (100 \text{ mg Trockensubstanz} \cdot \text{h})^{-1}$.

3.4 Durchführung der Lagerversuche

Im Verlauf der verschiedenen Versuchsjahre wurden im Einzelnen die in Tabelle 6 im Überblick gezeigten Lagerversuche und Analysen durchgeführt.

Tabelle 6: Übersicht zu den in den einzelnen Versuchsjahren durchgeführten Untersuchungen

Versuch	Versuchsjahr	Titel/ Thema	Durchgeführte Analysen
1	2007/2008	Einfluss verschiedener Lagerverfahren auf Fruchtreife und Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität - CO ₂ und Ethylenbildung - Aktivität zellwandabbauender Enzyme - Genexpression zellwandabbauender Enzyme
2	2007/2008	Einfluss von Calcium auf Fruchtreife und Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität - Mineralstoffanalysen - CO ₂ und Ethylenbildung - Aktivität zellwandabbauender Enzyme - Zellwandfraktionierung (Pektinabbau) - Genexpression zellwandabbauender Enzyme
3	2007/2008	Einfluss von Ethylen auf Fruchtreife und Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität - CO ₂ und Ethylenbildung
4	2008/2009	Shelf-life-Versuch bei 10°C	- Reifetest und Fruchtqualität - Aktivität zellwandabbauender Enzyme - Zellwandfraktionierung (Pektinabbau)
5	2008/2009	Einfluss verschiedener Lagerverfahren auf Fruchtreife und Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität - CO ₂ und Ethylenbildung
6	2008/2009	Einfluss von Ethylen auf Fruchtreife und Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität - CO ₂ und Ethylenbildung
7	2009/2010	Einfluss des Erntetermins auf die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität
8	2009/2010	Einfluss der Temperatur auf das Festigkeitsverhalten beim Apfel	- Reifetest und Fruchtqualität - CO ₂ und Ethylenbildung - Messungen der Gewebefestigkeit in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe
9	2010	Untersuchungen zur Wirkung von 1-MCP und Ethylen auf die Fruchtreife beim Apfel	- CO ₂ und Ethylenbildung

3.4.1 Untersuchungen zum Einfluss des Erntetermins

An den Sorten `Elstar`, `Pinova` und `Golden Delicious` wurde der Einfluss des Erntetermins auf Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel untersucht. Dazu wurde jede der drei Sorten in wöchentlichem Abstand zu 5 verschiedenen Terminen geerntet, wobei Termin 4 jeweils dem für Langzeitlagerung optimalen Termin entsprach. Bei `Golden Delicious` erfolgten nur 4 Erntetermine (T2-T5). In Tabelle 7 werden die Parameter Fruchtfleischfestigkeit, Stärkeabbau, Gehalt an löslicher Trockensubstanz sowie der berechnete Streif-Index für die einzelnen Erntetermine dargestellt.

Tabelle 7: Versuch zum Einfluss des Erntetermins auf die Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar`, `Pinova` sowie `Golden Delicious` Äpfeln: Fruchtfleischfestigkeit, Gehalt an löslicher Trockensubstanz (TSS = total soluble solids), Stärke-Index sowie Streif-Index zu den jeweiligen Ernteterminen.

Sorte	Parameter	Ernte 1	Ernte 2	Ernte 3	Ernte 4	Ernte 5
Elstar	Festigkeit [N]	76,2	70,7	68,7	61,4	60,7
	TSS [° Brix]	12,1	12,5	13,0	13,7	14,6
	Stärke [1-10]	1,0	1,0	1,9	3,9	4,4
	Streif-Index	0,64	0,58	0,29	0,12	0,10
Pinova	Festigkeit [N]	89,9	81,4	77,5	72,7	73,9
	TSS [° Brix]	11,8	12,5	12,8	13,3	13,8
	Stärke [1-10]	2,9	3,0	3,8	4,4	5,0
	Streif-Index	0,27	0,23	0,16	0,13	0,11
Golden D.	Festigkeit [N]		75,2	71,5	71,5	65,5
	TSS [° Brix]		13,3	13,1	13,8	13,5
	Stärke [1-10]		4,8	5,4	7,1	8,5
	Streif-Index		0,12	0,10	0,07	0,06

Im Anschluss an die Ernte wurden die Früchte bei 10°C unter normaler Atmosphäre und Folienabdeckung zur Minderung von Verdunstungsverlusten bis zu einer Dauer von 73 Tagen gelagert. Zu jeweils 10 Probenahmeterminen erfolgte die Messung der Fruchtfleischfestigkeit [N].

3.4.2 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur

Um den Einfluss der Temperatur auf das Festigkeitsverhalten bei verschiedenen Apfelsorten genauer zu prüfen, wurden Untersuchungen mit den Sorten `Elstar` sowie `Pinova` durchgeführt. Im Anschluss an die Ernte wurde die Hälfte der Versuchsfrüchte pro Sorte mit 1-MCP (625 ppb) behandelt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei 1°C, 3°C sowie 6°C bis zu 20 Wochen. In wöchentlichem Abstand wurde die Fruchtfleischfestigkeit [N] gemessen. Nach 8 Wochen Lagerung erfolgten zusätzliche Untersuchungen zur Gewebefestigkeit in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe (Kraft/Weg- Diagramm).

3.4.3 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Lagerverfahren

Um den Einfluss verschiedener Lagerverfahren auf Fruchtfleischfestigkeit und Fruchtreife beim Apfel zu erfassen wurden in zwei Jahren (2007/2008; 2008/2009) Versuche mit den beiden Sorten `Elstar` und `Pinova` durchgeführt. In Tabelle 8 werden die jeweiligen Erntetermine, Lagerbedingungen sowie Aus- und Nachlagertermine dargestellt.

Tabelle 8: Versuche zum Einfluss verschiedener Lagerverfahren auf Fruchtfleischfestigkeit und Fruchtreife beim Apfel (2007-2008; 2008-2009): Streif-Index, Lagerbedingungen, Ernte- sowie Analysetermine (Auslag.=Auslagerung; NL=Nachlagerung bzw. Shelf-life).

Jahr	Sorte	Streifindex (zur Ernte)	Lagerbedingungen				Termine					
			Lager	Temp. [°C]	O ₂ [%]	CO ₂ [%]	Ernte	NL I	Auslag. 1	NL II	Auslag. 2	NL III
2007/2008	Elstar	Ernte 1 = 0,17 Ernte 2 = 0,09	Kühllager	1	-	-	E. 1: 23.08.07 E. 2: 03.09.07	E. 1: 03.09.07 E. 2: 14.09.07	26.11.2007	06.12.2007	06.05.2008	13.05.2008
			CA	3	3	3						
			ULO	1	1	2,5						
	Pinova	Ernte 1 = 0,18 Ernte 2 = 0,16	Kühllager	1	-	-	E. 1: 10.09.07 E. 2: 19.09.07	E. 1: 21.09.07 E. 2: 01.10.07	10.12.2007	20.12.2007	14.05.2008	21.05.2008
			CA	3	2,5	3						
			ULO	1	1	2,5						
2008/2009	Elstar	Ernte = 0,12	Kühllager	1	-	-	09.09.2008	19.09.2008	26.01.2009	05.02.2009	02.06.2009	15.06.2009
			ULO	1	1	2,5						
	Pinova	Ernte = 0,14	Kühllager	1	-	-	29.09.2008	09.10.2008	26.01.2009	05.02.2009	02.06.2009	15.06.2009
			ULO	1	1	2,5						

In 2007/2008 erfolgte die Ernte zu zwei Terminen, wobei der erste Termin einem für die CA-Lagerung üblichen Zeitpunkt entsprach. Da bei anschließender Behandlung mit 1-MCP ein verzögerter Erntetermin empfohlen wird, um eine ausreichende geschmackliche Qualität zu gewährleisten, wurde die zweite Ernte 10 Tage verzögert durchgeführt und entspricht damit einem für die 1-MCP-Behandlung geeigneten Erntezeitpunkt. In 2008/2009 erfolgte die Ernte nur zu einem Termin. Unmittelbar nach der Ernte wurden die Äpfel randomisiert in Versuchskisten sortiert und die Hälfte der Versuchsäpfel in gasdichten Lagerbehältern während 24 Stunden bei 1°C mit 1-MCP (625 ppb) behandelt (siehe Kapitel 3.4.7). Die Lagerung der unbehandelten Kontrollfrüchte erfolgte während dieser Zeit ebenfalls bei 1°C im Kühllager. Anschließend wurden die Behälter geöffnet und die Früchte entsprechend unter Kühllager-, CA- oder ULO- Bedingungen eingelagert (siehe Tab. 8). In 2007/2008 wurde zusätzlich eine "Energiespar-Variante" bei 3°C durchgeführt. Da bei `Elstar` in dieser CA-Lagervariante technische Fehler bei der Regulierung der CA-Konzentrationen auftraten, konnten die Ergebnisse nicht für weiterführende Auswertungen verwendet werden. Im Anschluss an die einzelnen Auslagertermine wurden die Früchte einer Nachlagerung bei 20°C unterzogen, um Verkaufsbedingungen (Shelf-life) zu simulieren. Während dieser Nachlagerphase erfolgten täglich Messungen der Atmung sowie in zweitägigen Abständen der Ethylenproduktion der Früchte (siehe Kapitel 3.1.2; 3.1.3). Zur Ernte, zu den Auslagerterminen sowie am Ende der jeweiligen Nachlagerung (NL I, NL II, NL III) wurde die Fruchtfleischfestigkeit der Früchte gemessen. Im ersten Versuchsjahr erfolgten zur Ernte bzw. im Anschluss an die Nachlagerungen NL I und NL III außerdem Probenahmen für Analysen der Genexpression (Polygalacturonase, β -Galactosidase, Expansin, Xyloglucan-Endotransglucosylase, Arabinofuranosidase, Pectatlyase) sowie Aktivität zellwandabbauender Enzyme (β -Galactosidase, Pektinmethylesterase, siehe Kapitel 3.2.3.2 bzw. 3.3.3).

3.4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Ca-Infiltrationen

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss von Calcium auf die Fruchtfleischfestigkeit sowie auf Veränderungen im Bereich der Zellwände beim Apfel am Beispiel der Sorte `Elstar` genauer zu untersuchen. Unmittelbar nach der Ernte (Streif-Index = 0,17) wurde zunächst die Hälfte der Versuchsfrüchte mit 1-MCP (625 ppb während 24 h) behandelt. Drei Tage nach

der Anwendung erfolgte die Ca-Applikation. Um eine ausreichende Calciumaufnahme der Früchte zu gewährleisten wurden die Äpfel vakuuminfiltiert. Abbildung 17 zeigt den schematischen Aufbau der Infiltrationsanlage.

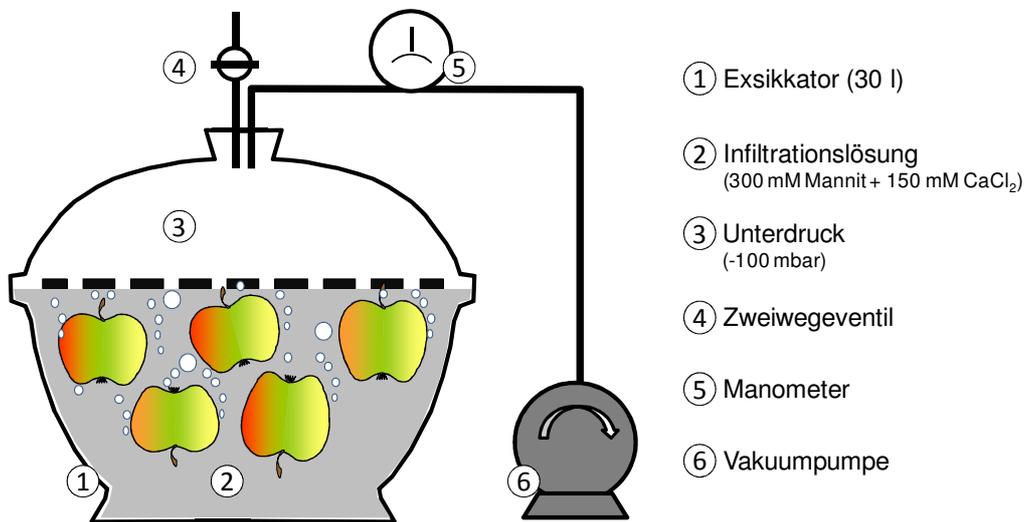


Abbildung 17: Schematischer Aufbau der Anlage zur Durchführung von Ca-Infiltrationen.

Die Infiltration erfolgte bei einem Unterdruck von 100 mbar. Die Früchte wurden zusammen mit der Infiltrationslösung in einen Exsikkator (Volumen: 30 l) gegeben und Unterdruck angelegt, wodurch den Früchten aus den Interzellularen sowie aus dem Kerngehäuse Luft entzogen wurde. Nach Reduzieren des Unterdruckes wurde die Infiltrationslösung von den Äpfeln aufgenommen. Die Überprüfung der Wirksamkeit der Infiltration erfolgte durch Wiegen der Einzelfrüchte vor und nach der Behandlung. Um Zellschädigungen bei der Infiltration zu vermeiden, wurde mit einer isotonischen Mannit-Lösung gearbeitet. Die Zusammensetzung der Lösung betrug für die Ca-Variante 300 mM Mannit + 150 mM CaCl₂, für die Kontrolle (ohne Ca) ausschließlich 300 mM Mannit. Wie die Mineralstoffanalysen ergaben bewirkte die Infiltration in etwa eine Verdoppelung der Calciumkonzentration in den Früchten von 4,48 mg auf 9,42 mg Ca/100 g Frischsubstanz.

Im Anschluss an die Behandlung erfolgte an den infiltrierten Früchten eine Probenahme für die Durchführung der Mineralstoffanalysen (siehe Kapitel 3.1.5). Der Probenumfang betrug dabei jeweils 25 Früchte. Sodann wurden die Versuchs-Äpfel bei 1°C im Kühl- bzw. CA-Lager (3 kPa O₂ / 3 kPa CO₂) für 4,5 bzw. für 9 Monate gelagert. Nach der Lagerung erfolgte eine

Nachlagerung bei 20°C wobei die Dauer der Nachlagerung zur ersten Auslagerung 11 Tage, zum zweiten Termin 7 Tage betrug. Während der Nachlagerung wurden CO₂- sowie Ethylenproduktion der Äpfel gemessen. Die Fruchtfleischfestigkeit wurde zur Ernte, zu den Auslagerterminen sowie am Ende der beiden Nachlagerungen bestimmt. Zudem erfolgten zur Ernte, am Ende der ersten Auslagerung sowie nach der anschließenden Shelf-Life Phase Probenahmen zur Untersuchung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme (β -Galactosidase, Pektinmethylesterase) sowie für die Durchführung von Zellwandfraktionierungen zur Untersuchung des Pektinabbaus. Nach dem Shelf-Life im Anschluss an Auslagerung 1 erfolgten außerdem Analysen der Genexpression zellwandabbauender Enzyme (Polygalacturonase, β -Galactosidase, β -Xylosidase, Endoglucanase, Pectatlyase, Pektinmethylesterase) (siehe Kapitel 3.2.3.1).

3.4.5 Untersuchungen zum Einfluss von Ethylenbehandlungen

Um den Einfluss von Ethylen in Verbindung mit 1-MCP auf Fruchtfleischfestigkeit und Fruchtreife zu untersuchen wurden insgesamt drei Versuche in den Jahren 2007/2008, 2008/2009 sowie Ende 2010 durchgeführt. Dabei sollte anhand von Applikationen mit externem Ethylen unter anderem untersucht werden, ob es sich bei der reifeverzögernden Wirkung des Ethyleninhibitors 1-MCP um einen reversiblen Vorgang handelt. In 2007/2008 sowie 2008/2009 erfolgte die Durchführung der Versuche mit der Sorte `Elstar`, in 2010 wurde `Golden Delicious` verwendet. Tabelle 9 gibt Informationen zu Erntetermin, Streif-Index, Lagerbedingungen sowie den jeweiligen Analysenterminen für Aus- und Nachlagerung.

Tabelle 9: Versuche zum Einfluss von Ethylenbehandlungen auf Fruchtfleischfestigkeit und Fruchtreife beim Apfel: Streifindex, Lagerbedingungen, Ernte- sowie Analysetermine (Auslag. = Auslagerung; NL = Nachlagerung).

Jahr	Sorte	Streifindex (zur Ernte)	Lagerbedingungen				Termine				
			Lager	Temp. [°C]	O ₂ [%]	CO ₂ [%]	Ernte	Auslag. 1	NL II	Auslag. 2	NL III
2007/2008	Elstar	Ernte 1 = 0,17	ULO	1	1	2,5	E. 1: 23.08.07	07./08.01.08	17./18.01.08	29.05.08	05.06.08
		Ernte 2 = 0,09					E. 2 : 03.09.07				
2008/2009	Elstar	Ernte 1 = 0,12	ULO	1	1	2,5	E. 1: 09.09.08	09.03.09	19.03.09	-	-
		Ernte 2 = 0,09					E. 2 : 18.09.08				
2010	Golden Delicious	Ernte = 0,12	Shelf-life	20	-	-	15.10.2010	13 Tage Shelf-life bei 20°C			

3.4.5.1 Untersuchungen mit der Sorte `Elstar`

In den ersten beiden Versuchsjahren erfolgte die Ernte zu jeweils zwei Terminen, wobei in 2007/2008 die Ernte den in Versuch 1 beschriebenen Terminen entsprach. In 2007/2008 wurde nach der Applikation von 1-MCP (625ppb, 24 h) im Anschluss an die Ernte die Menge der Versuchsfrüchte in zwei Partien aufgeteilt und in zwei getrennten Behältern bei 1°C unter ULO-Bedingungen (siehe Tab. 8) eingelagert. In einem der beiden Behälter erfolgte während der Lagerung eine wiederkehrende Behandlung mit C₂H₄ in wöchentlich drei Applikationen mit jeweils 200-300 ppm (bezogen auf die Konzentration im Lagerbehälter). Bei der zweiten Partie wurde die Ethylenbehandlung erst im Anschluss an die Auslagerung zu Beginn der Shelf-Life Phase mit 1000 ppm H₂O₄ durchgeführt. In beiden Fällen erfolgte die Ethylen-Behandlung mit dem Produkt Lenogan® (4% C₂H₄ , Rest N₂), welches bei der Bananenreife Verwendung findet. Zur Behandlung während der Lagerung wurde bei jeder Applikation die entsprechende Menge Lenogan® über einen Druckminderer direkt aus der Druckgasflasche in den Lagerbehälter eingeleitet. Zur C₂H₄-Anwendung im Anschluss an die Lagerung wurden die Äpfel in gasdichte Kunststoffbehälter (Volumen: 30 l) eingeschlossen und mithilfe einer 200 ml Glasspritze die entsprechende Menge Lenogan® zugegeben. Die Früchte in den Gläsern der Respirationmessanlage wurden ebenfalls direkt mit Ethylen aus 60 ml Kunststoffspritzen behandelt. Die Applikation in den geschlossenen Behältern erfolgte

während 12 Stunden. Nach anschließendem Lüften wurden die Gläser wieder an die Respirationssystemanlage angeschlossen.

In 2008/2009 erfolgte die Ethylenapplikation im Anschluss an die Lagerung zunächst durch eine Minute Tauchbehandlung mit dem Produkt Flordimex® 420 (= 420 g/l Ethephon) mit 1000 ppm Ethylen. Da nach zwei Tagen Shelf-Life bei 20°C im Anschluss an die Behandlung bezüglich des Reifeverhaltens der Äpfel kein Unterschied zwischen den Varianten festgestellt werden konnte, wurden die Äpfel erneut entsprechend der Versuchsdurchführung im ersten Jahr mit Ethylen (Lenogan®) behandelt.

Zu den einzelnen Auslagerterminen wurden die Äpfel einer Nachlagerung bei 20°C und Respirations- sowie Ethylenmessungen unterzogen. Außerdem erfolgten zur Ernte, zu den Auslagerterminen sowie nach dem Shelf-Life Bestimmungen der Fruchtfleischfestigkeit sowie die Entnahme von Proben zur Durchführung weiterer Untersuchungen (Enzymaktivität, Pektinabbau). Da in beiden Jahren zu keinem der Probenahmetermine ein eindeutiger Einfluss der Ethylenbehandlung auf Fruchtfleischfestigkeit, Atmung bzw. Ethylenproduktion festgestellt werden konnte, wurde jedoch auf weiterführende Analysen mit der Sorte ‚Elstar‘ verzichtet.

3.4.5.2 Untersuchungen mit der Sorte ‚Golden Delicious‘

Da in den ersten beiden Versuchsjahren mit ‚Elstar‘, einer Sorte die selbst relativ wenig Ethylen produziert, kein eindeutiger Effekt der Ethylenbehandlungen beobachtet werden konnte, erfolgten 2010 Untersuchungen mit der Sorte ‚Golden Delicious‘. Nach dem Sortieren bzw. Randomisieren der Äpfel wurden diese in vier Partien aufgeteilt. Bei zwei Partien erfolgte am Tag der Ernte eine Behandlung bei 3°C mit 1000 ppm Ethylen (Lenogan®) bzw. 625 ppb 1-MCP durch Injektion in gasdichten Behältern (26,4 Liter), die anderen beiden Partien blieben unbehandelt. Nach ca. 20 Stunden wurden die Behälter geöffnet und die Früchte in die Gläser der Respirationssystemanlage (20°C) überführt. Nach drei Tagen erfolgte eine erneute Behandlung der Früchte. Ein Teil der Varianten wurde dabei mit Ethylen oder 1-MCP behandelt bzw. blieb unbehandelt. In Tabelle 10 werden die entsprechenden Behandlungen der Varianten zum besseren Verständnis dargestellt.

Tabelle 10: Behandlungsvarianten Ethylenversuch 2010 mit `Golden Delicious`.

Variante	Behandlung am 15.10.2010	Behandlung am 19.10.2010
1	keine Behandlung	keine Behandlung
2	keine Behandlung	mit Ethylen
5	keine Behandlung	1-MCP
3	1-MCP	keine Behandlung
4	1-MCP	mit Ethylen
6	mit Ethylen	keine Behandlung
7	mit Ethylen	1-MCP

Während der 13-tägigen Shelf-Life-Phase erfolgten täglich Messungen der CO₂-Produktion bzw. in zweitägigen Abständen der Ethylenabgabe. Zum letzten Analysetermin wurde zusätzlich die Fruchtfleischfestigkeit der Äpfel bestimmt.

3.4.6 Shelf-Life- Versuch bei 10°C

Die Äpfel der Sorten `Elstar` und `Pinova` für diesen Versuch stammten jeweils von einem Erntetermin (Streif-Index: Elstar 0,12; Pinova 0,11). Nach der Behandlung der Hälfte der Äpfel mit 1-MCP (625 ppb) wurden die Früchte während 10 Wochen bei 10°C und normaler Atmosphäre gelagert, wobei sie zur Reduzierung des Wasserverlustes mit Plastikfolie abgedeckt wurden. In wöchentlichen Abständen erfolgten Probenahmen zur Bestimmung der Fruchtfleischfestigkeit sowie zur Durchführung weiterführender Untersuchungen (Aktivität zellwandabbauender Enzyme, Zellwandfraktionierungen).

3.4.7 Methode zur 1-MCP- Applikation

Die Behandlung der Früchte mit 625 ppb 1-MCP (1-Methylcyclopropan) erfolgte im Anschluss an die Ernte in gasdichten Lagerbehältern (0,5 m³) bei einer Temperatur von 1-3°C. Pro Behandlung wurden dazu 0,5 g des Handelsproduktes SmartFresh™ in eine mit einem Septum verschlossene 50 ml Spritze eingewogen. Über das Septum wurden ca. 4 ml Wasser hinzugegeben und bis zum Lösen des SmartFresh-Pulvers mehrmals geschüttelt. Anschließend erfolgte die Injektion des Spritzeninhalts über eine Schlauchverbindung in den Lagerbehälter. Nach 24 h Applikationszeit wurden die Behälter geöffnet, gelüftet und danach

mit der jeweiligen Lagerung begonnen. Die Lagerung der unbehandelten Kontrolle erfolgte während der SmartFresh™-Behandlung bei identischen Temperaturen.

3.5 Statistische Auswertung

Die Durchführung der Varianzanalysen sowie der anschließende Mittelwertvergleich erfolgten mit der Statistik-Software MiniTab V 14 für Windows (MiniTab Inc.) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (= signifikant) sowie 1 % (= hoch signifikant). Ergab sich in den Varianzanalysen ein mindestens signifikanter Einfluss ($p \leq 0,05$) der Faktoren auf den geprüften Parameter, so wurde zur Berechnung der Grenzdifferenzen der Bonferroni-Test bei $p \leq 0,05$ durchgeführt. Die sonstige Bearbeitung der Daten, Berechnung der Standardabweichungen sowie graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2007.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Versuchsjahre beschrieben. Die Kapitel im Ergebnisteil gliedern sich dabei nach den untersuchten Parametern Fruchtfleischfestigkeit, Frucht reife (CO_2 - und Ethylenbildung), Genexpression zellwandabbauender Enzyme, Aktivität zellwandabbauender Enzyme sowie Zellwandabbau (Zellwandfraktionierung). In den Abschnitten der einzelnen Kapitel werden die Resultate zum Einfluss verschiedener Faktoren, wie Erntetermin, Lagermethode, 1-MCP, Calcium usw. auf den entsprechenden Parameter beschrieben.

In den tabellarischen Darstellungen geben die Spalten mit der Bezeichnung "Einfluss" an, ob der jeweilige Faktor einen signifikanten Einfluss auf den untersuchten Parameter hatte, wobei ** = hochsignifikant ($p \leq 0,01$), * = signifikant ($p \leq 0,05$), bzw. n.s. = nicht signifikant bedeuten. Die Buchstaben in den Spalten mit der Bezeichnung "Sign." zeigen, zwischen welchen Mittelwerten mindestens signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$; ungleiche Buchstaben) bzw. keine Unterschiede (gleiche Buchstaben) festgestellt werden konnten. Zwischen den Werten, die im gleichen Buchstabenformat (groß, klein, kursiv) gekennzeichnet werden, erfolgte dabei der entsprechende Mittelwertvergleich.

4.1 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Fruchtfleischfestigkeit

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zum Einfluss von Erntetermin, Lagermethode, 1-MCP, Temperatur, Calcium sowie Ethylen auf die Fruchtfleischfestigkeit der beiden Apfelsorten `Elstar` und `Pinova` beschrieben. Vorangestellt ist ein erster Teilabschnitt (4.1.1), der sich mit methodischen Untersuchungen zur Veränderung der Fruchtfleischfestigkeit bei beiden Sorten in Abhängigkeit der Eindringtiefe des Messstempels in das Fruchtgewebe befasst.

4.1.1 Fruchtfleischfestigkeit in Abhängigkeit der Fruchtfleischtiefe und der Sorte

Um die Festigkeitseigenschaften der beiden Sorten zu charakterisieren, wurden Untersuchungen mit einem Spezialgerät der Firma Zwick zur Werkstoffprüfung durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.4). In den Abbildungen 17 A und B werden exemplarisch Kraft-Weg-

Diagramme zum Zusammenhang zwischen Fruchtfleischtiefe und -festigkeit dargestellt. Dabei handelt es sich um die Messwerte von zwei Einzelfrüchten der Sorte `Elstar` ohne (A) bzw. mit 1-MCP (B) nach 8 Wochen Lagerung bei 1°C. Bis zu einer Eindringtiefe von ca. 3 mm zeigt sich bei beiden Früchten zunächst eine deutliche Zunahme bei der zum Eindringen des Stempels in das Fruchtgewebes notwendigen Kraft, was letztlich der Festigkeit des Fruchtgewebes entspricht. An der 1-MCP behandelten Frucht (B) steigt die Kurve anfangs deutlich steiler an und erreicht im Vergleich zur Kontrolle (~40N) höhere Festigkeitswerte von bis zu 70 N. Im Anschluss kann bei beiden Varianten ein kurzes, abruptes Absinken der gemessenen Festigkeit durch das Brechen der Zellen beim tieferen Eindringen des Stempels ins Fruchtfleisch beobachtet werden. Während anschließend bei der unbehandelten Kontrollfrucht der Festigkeitswert bis zu einer Eindringtiefe von 10 mm kaum weiter ansteigt, zeigt sich an der 1-MCP behandelten Frucht erneut eine deutliche Zunahme des Festigkeitswertes bis auf 75 N.

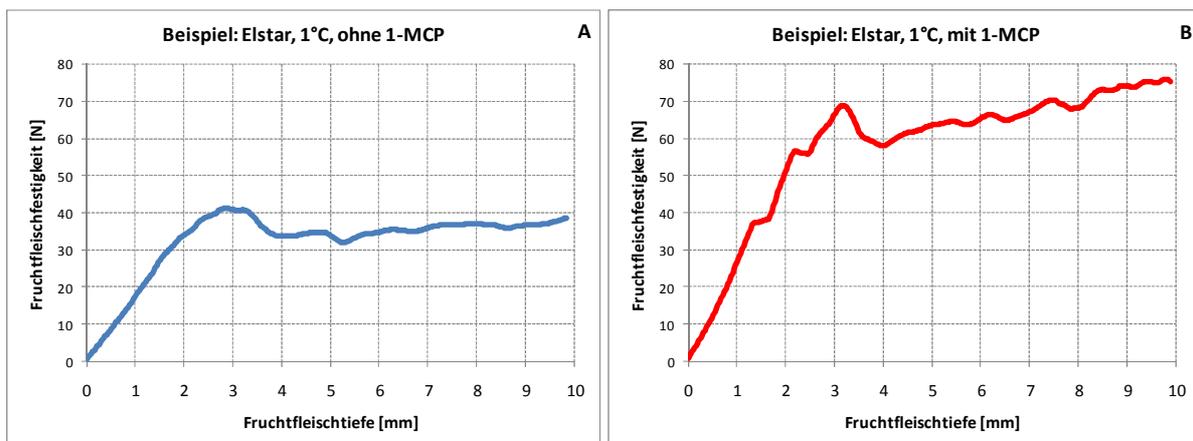


Abbildung 17: Kraft-Weg-Diagramm zum Zusammenhang zwischen Fruchtfleischtiefe und -festigkeit bei `Elstar` ohne (A) und mit (B) 1-MCP nach 8 Wochen Lagerung bei 1°C am Beispiel einer typischen Einzelfrucht (Versuch 8: 2009/2010).

Abbildung 18 stellt den Verlauf der Kraft-Weg-Kurven bei unbehandelten bzw. 1-MCP behandelten `Elstar` und `Pinova` Äpfeln nach 8 Wochen Lagerung in Abhängigkeit der Lagertemperatur (1°C, 3°C, 6°C) dar. Die einzelnen Linien ergaben sich dabei nicht wie in Abb. 17 aus den Werten von Einzelfrüchten, sondern aus Mittelwerten von jeweils 20 Äpfeln.

Die 1-MCP Behandlung hatte bei beiden Sorten einen inhibierenden Effekt auf das Weichwerden der Früchte, wobei der Unterschied zwischen 1-MCP behandelten und unbehandelten Früchten bei `Elstar` deutlich größer war als bei `Pinova`. Bei `Elstar` waren in allen drei Temperaturvarianten die 1-MCP behandelten Äpfel deutlich fester als die Kontrollfrüchte. Während bei den Kontrollfrüchten die Festigkeit mit steigender Temperatur abnahm waren an den 1-MCP-Varianten keine Unterschiede zwischen 1, 3 und 6°C zu erkennen. Bei allen Varianten war nach Eindringen des Stempels ins Fruchtfleisch (erster Peak) durchschnittlich ein weiterer Anstieg der Messwerte mit zunehmender Eindringtiefe zu verzeichnen. Bei `Pinova` blieben auch die Kontrollvarianten mit höherer Temperatur deutlich stabiler als bei `Elstar`. Hier zeigten sich nur zwischen den bei 3°C und bei 6°C gelagerten Äpfeln leichte Unterschiede. Letztere wurden tendenziell etwas früher weich bzw. wiesen in unterschiedlicher Fruchtfleischtiefe etwas geringere Festigkeitswerte auf. Zwischen den restlichen Varianten konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Insgesamt entsprach das Kraft-Weg-Diagramm bei den 1-MCP behandelten `Elstar` Früchten in etwa dem Verlauf bei `Pinova` ohne 1-MCP.

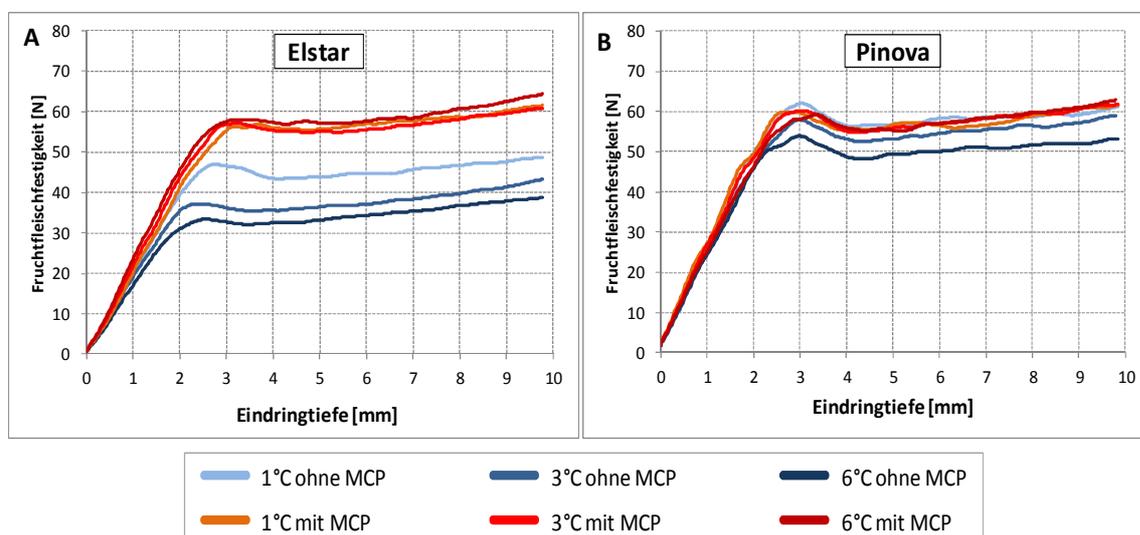


Abbildung 18: Kraft-Weg-Diagramm zum Zusammenhang zwischen Fruchtfleischtiefe und -festigkeit bei `Elstar` (A) und `Pinova` (B) mit und ohne 1-MCP nach 8 Wochen Kühlagerung bei 1, 3 und 6°C (Versuch 8: 2009/2010).

4.1.2 Einfluss des Erntetermins

Wie Tabelle 11 zeigt, war in den Untersuchungen zur Wirkung der Lagermethoden in 2007/2008 nur bei `Elstar` ein Einfluss des Erntetermins auf die Fruchtfleischfestigkeit festzustellen. Früchte der ersten Ernte hatten dabei deutlich höhere Festigkeitswerte als die der späteren Pflücken. Dies war zu beiden Terminen sofort zur Auslagerung sowie am Ende der Nachlagerungen, sowohl im Kühl- wie auch im CA-Lager an 1-MCP behandelten und an unbehandelten Äpfeln der Fall. Bei `Pinova` hingegen zeigte der Erntetermin in diesem Versuch keinen Einfluss auf die Festigkeit (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Einfluss von Erntetermin, Auslagertermin, Lagermethode, Nachlagerung sowie 1-MCP auf die Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` und `Pinova` (Versuch 1: 2007/2008) ($p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Elstar: Fruchtfleischfestigkeit [N]			Pinova: Fruchtfleischfestigkeit [N]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Ernte	Ernte 1	**	60,1	a	n.s.	75,0	a
	Ernte 2	**	54,6	b		75,9	a
Auslager-termin	Auslagerung 1	**	60,0	A	**	76,9	A
	Auslagerung 2	**	54,7	B		73,9	B
Lagermethode	Kühlager		52,3	b	**	69,2	b
	CA-Lager	**	-	-		78,6	a
	ULO-Lager		62,4	a		78,4	a
Nach-lagerung	sofort (zur Ausl.)	**	59,9	A	**	73,5	B
	Nachlagerung	**	54,8	B		77,3	A
1-MCP	ohne 1-MCP	**	49,9	b	**	72,1	b
	mit 1-MCP	**	64,8	a		78,7	a

In den Versuchen mit Ethylenbehandlungen bei `Elstar` in 2007/2008 (Versuch 3) und 2008/2009 (Versuch 6) hatte der Erntetermin hochsignifikanten Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit (Tab. 16, 17) bei Ende der Nachlagerungen. Dabei waren erneut die Früchte des ersten Termins fester als die der späteren Pflücken. Dies konnte in beiden Jahren sowohl an 1-MCP behandelten sowie an unbehandelten Früchten beobachtet werden.

Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss des Erntetermins auf das Weichwerden von `Elstar`, `Pinova` und `Golden Delicious` Äpfeln bei 10°C zeigt die Abbildung 19. Auf die Darstellung der Standardabweichungen in den Graphiken wurde der Übersichtlichkeit wegen verzichtet. Bei der Sorte `Elstar` und zum Teil auch bei `Golden Delicious` lies sich der Prozess des Weichwerdens in drei Phasen teilen. Bei `Elstar` zeigte sich die Festigkeit in Phase 1 während der ersten 10-14 Tage stabil. Anschließend war in Phase 2 ein intensiver Festigkeitsverlust bis ca. 25 bis 30 Tage nach Shelf-life-Beginn zu beobachten. Die später geernteten Früchte wurden dabei tendenziell etwas früher weich als die der frühen Erntetermine. Bis zu diesem Zeitpunkt verlief der Festigkeitsabbau der unterschiedlichen Varianten in etwa parallel, wobei die früheren Pflücken nach wie vor die höchsten Festigkeitswerte zeigten. Die späte Ernte hatte bereits zu Beginn von Phase 3 nahezu die Endwerte der Festigkeit erreicht, so dass bei diesen im weiteren Verlauf kaum noch Veränderungen zu sehen waren. Bei allen anderen Varianten war während Phase 3 ein leichter Festigkeitsabbau zu messen, wobei dieser bei früherem Erntetermin mit größerer Verzögerung ablief. Ab 45 Tagen nach Shelf-life-Beginn unterschieden sich die verschiedenen Varianten nicht mehr voneinander. Die Endwerte der Festigkeit lagen bei `Elstar` bei ca. 45 N. `Golden Delicious` zeigte mit `Elstar` vergleichbare Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit in drei Phasen. Tendenziell setzte bei `Golden Delicious` das Weichwerden der Äpfel etwas früher ein. Die Werte am Ende der Shelf-life-Phase lagen mit ca. 35 bis 40 N niedriger als bei `Elstar`. Ab ca. 30 Tagen nach Beginn der Messungen waren kaum mehr signifikante Unterschiede zwischen den Erntetermin-Varianten festzustellen.

Der Verlauf des Festigkeitsabbaus der Sorte `Pinova` unterschied sich deutlich von dem der anderen beiden Sorten. Hier waren während des Weichwerdens keine unterschiedlichen Phasen zu erkennen. Der Verlust an Festigkeit zeigte sich deutlich weniger intensiv als bei `Elstar` und `Golden Delicious` und verlief kontinuierlich über die gesamte Shelf-life-Periode. Die Unterschiede zwischen den Erntetermin-Varianten blieben dabei erhalten. Äpfel des vierten sowie des fünften Pflücktermins unterschieden sich bezüglich der Festigkeit zu keinem Zeitpunkt. Die Festigkeitswerte zum Ende der Shelf-life Phase lagen mit ca. 63 bis 73 N deutlich über denen der anderen beiden Sorten.

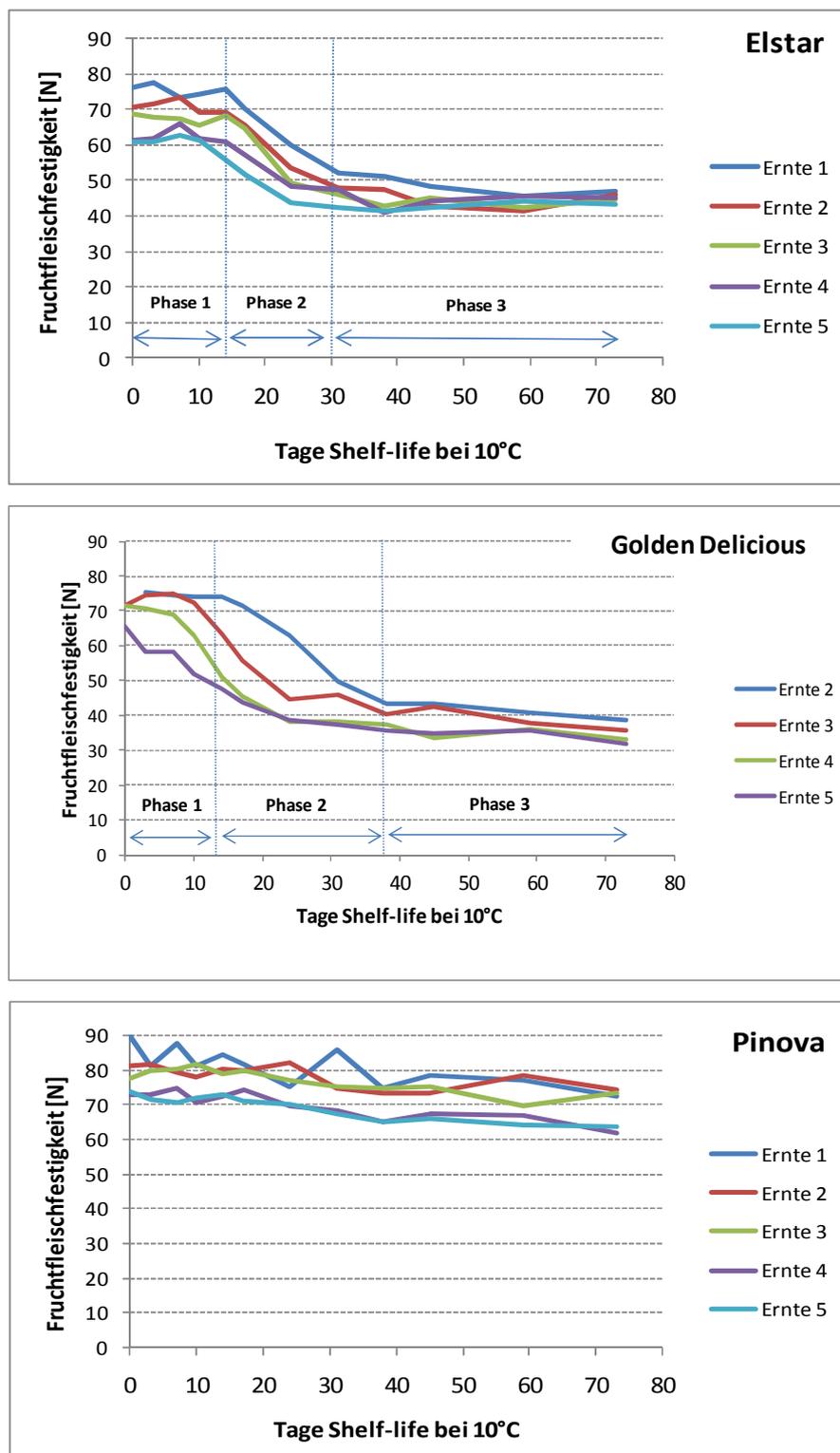


Abbildung 19: Festigkeitsabbau bei Früchten der Sorten `Elstar`, `Golden Delicious` und `Pinova` von verschiedenen Ernteterminen während 73 Tagen Shelf-life bei 10°C im Anschluss an die jeweilige Ernte (Versuch 7: 2009/2010).

4.1.3 Einfluss der Lagermethode

Die Abbildungen 20 und 21 zeigen exemplarisch den Einfluss der Lagermethode auf die Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` Äpfeln des ersten Erntetermins nach 9,5 Monaten sowie bei `Pinova` Früchten des ersten Erntetermins nach 8 Monaten Lagerung (Versuch 1: 2007/2008). Für `Elstar` wie auch für `Pinova` ergaben die Untersuchungen einen signifikanten Einfluss der Lagermethode auf die Fruchtfleischfestigkeit (Tab. 11). Dabei war die Festigkeit der ULO-Varianten deutlich höher als die der Früchte aus dem Kühllager. CA-gelagerte `Elstar` waren bei diesem Lagervergleich nicht verfügbar. Der Einfluss der Lagermethode war bei `Elstar` zu beiden Auslagerterminen sowohl im unmittelbaren Anschluss an die Lagerung wie auch nach dem Shelf-life, an Früchten beider Ernteterminen, an 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Äpfeln festzustellen.

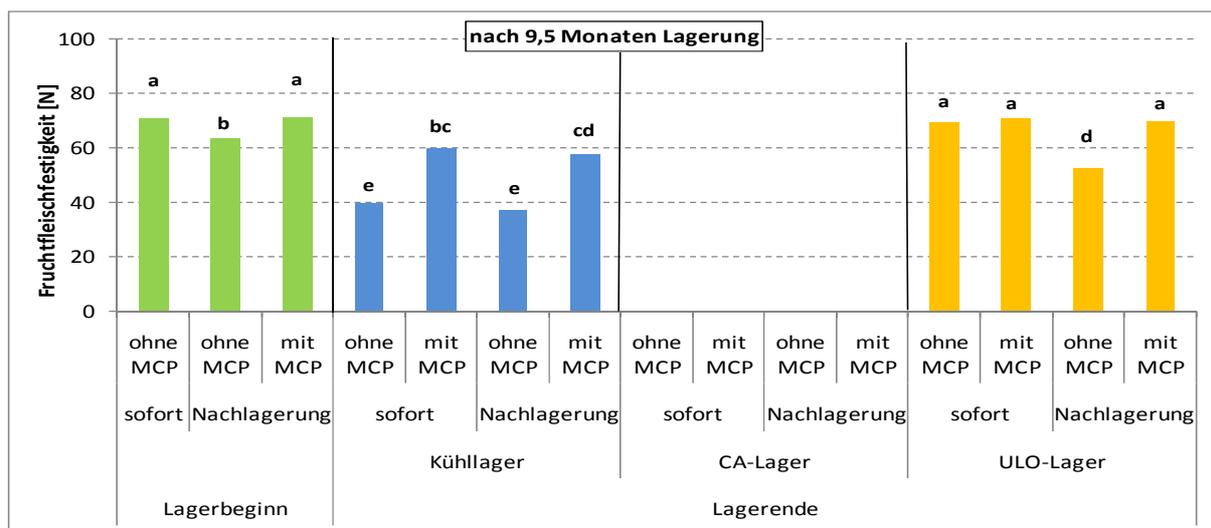


Abbildung 20: Fruchtfleischfestigkeit 1-MCP-behandelter sowie unbehandelter `Elstar` Äpfel des ersten Erntetermins zu Lagerbeginn und nach 9,5 Monaten Lagerung, jeweils sofort nach Lagerende sowie nach 7 Tagen Shelf-life bei 20°C. Die Ergebnisse aus dem CA-Lager waren nicht auswertbar (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

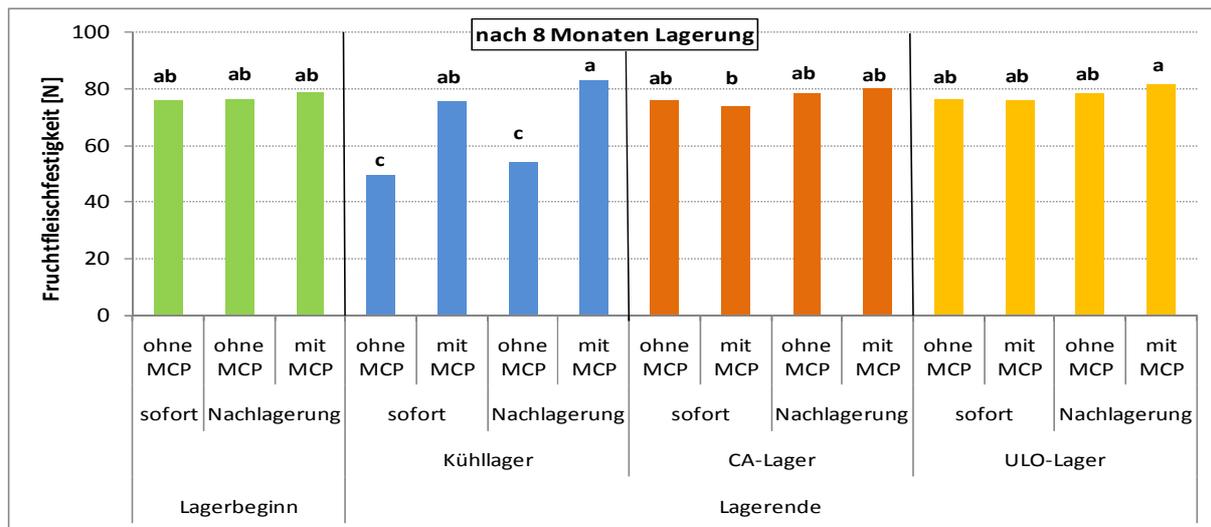


Abbildung 21: Fruchtfleisfestigkeit 1-MCP-behandelter sowie unbehandelter 'Pinova' Äpfel des ersten Erntetermins zu Lagerbeginn und nach 8 Monaten Lagerung, jeweils sofort nach Lagerende sowie nach 7 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Bei 'Pinova' konnte zwischen der CA-Variante und den bei ULO-Bedingungen gelagerten Äpfeln kein Unterschied festgestellt werden (Tab. 11). Der Einfluss der Lagermethode war bei 'Pinova' ebenfalls zu beiden Auslagerungen "sofort" sowie nach der Nachlagerung zu beobachten, jedoch bestanden hier Wechselwirkungen zwischen Lagermethode und 1-MCP Behandlung. Die Lagermethoden unterschieden sich nur bei den Kontrollfrüchten ohne 1-MCP, nicht jedoch bei den 1-MCP-behandelten Äpfeln.

Im Kühllager war bei beiden Sorten bereits zur Auslagerung ein deutlicher Effekt der 1-MCP Behandlung zu sehen, bei den unter ULO Bedingungen gelagerten 'Elstar' Äpfeln erst im Anschluss an die Nachlagerung. Bei 'Pinova' zeigte sich im ULO-Lager diesbezüglich kein Einfluss von 1-MCP (siehe Kapitel 4.1.4).

Wie bereits in 2007/2008 konnte der positive Einfluss der ULO-Lagerung auf den Erhalt der Fruchtfleisfestigkeit auch in 2008/2009 bestätigt werden. Die ULO-Varianten zeigten durchschnittlich höhere Festigkeitswerte als die Äpfel aus dem Kühllager (Tab. 12). Der Effekt der 1-MCP Behandlung war ebenfalls im Kühllager deutlich stärker als im ULO-Lager, wie die Abbildungen 22 und 23 zeigen. Bei 'Pinova' brachte 1-MCP an den ULO-Varianten keine zusätzliche Wirkung (siehe Kapitel 4.1.4).

Tabelle 12: Mehrfaktorielle Auswertung zum Einfluss von Lagerdauer, Lagermethode, Nachlagerung (bei 20°C) sowie 1-MCP auf die Fruchtfleischfestigkeit bei 'Elstar' und 'Pinova' (Versuch 5: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Elstar: Fruchtfleischfestigkeit [N]			Pinova: Fruchtfleischfestigkeit [N]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Auslager-termin	Auslagerung 1	**	55,5	A	**	72,3	A
	Auslagerung 2		47,1	B		69,6	B
Lagermethode	Kühlager	**	45,5	b	**	66,5	b
	ULO-Lager		57,1	a		75,4	a
Nach-lagerung	sofort (zur Ausl.)	**	48,1	A	n.s.	71,9	A
	Nachlagerung		54,4	B		70,0	A
1-MCP	ohne 1-MCP	**	45,1	b	**	64,7	b
	mit 1-MCP		57,4	a		77,2	a

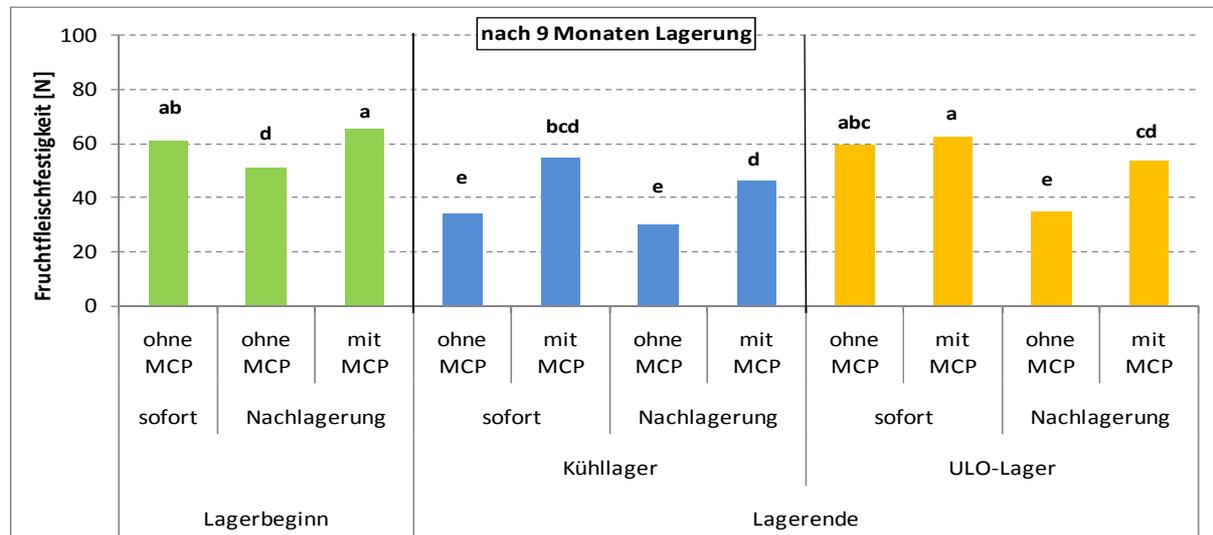


Abbildung 22: Fruchtfleischfestigkeit 1-MCP-behandelter sowie unbehandelter 'Elstar' Äpfel zu Lagerbeginn und nach 8,5 Monaten Lagerung, jeweils sofort nach Lagerende sowie nach 13 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 5: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

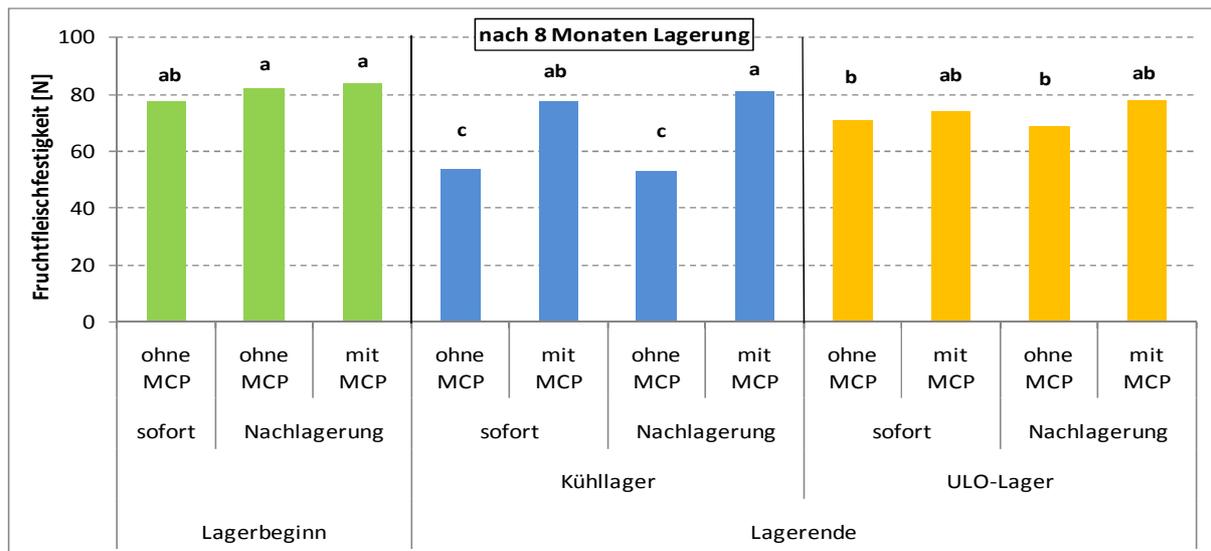


Abbildung 23: Fruchtfleischfestigkeit 1-MCP-behandelter sowie unbehandelter `Pinova` Äpfel zu Lagerbeginn und nach 8 Monaten Lagerung, jeweils sofort nach Lagerende sowie nach 13 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 5: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

In den Untersuchungen zum Einfluss von Calcium auf die Fruchtfleischfestigkeit hatte die Lagermethode nur zur zweiten Auslagerung nach 9 Monaten einen Einfluss, nicht jedoch nach 4,5 Monaten (Tab. 15). Unterschiede zwischen den Lagermethoden waren dabei zudem nur unmittelbar im Anschluss an die Lagerung sowie nur an 1-MCP behandelten Früchten festzustellen. Die Kühllagervariante ohne Ca-Infiltration war zu diesem Zeitpunkt deutlich weicher als die CA-Varianten bzw. die Früchte aus dem Kühllager in Kombination mit Calcium (Abb. 27, Kapitel 4.1.6).

4.1.4 Einfluss von 1-MCP

In den Untersuchungen zum Einfluss der 1-MCP Behandlung auf die Fruchtfleischfestigkeit in 2007/2008 (Versuch 1) war sowohl bei `Elstar` wie auch bei `Pinova` eine hochsignifikante Wirkung zu beobachten (Tab. 11). Höhere Festigkeitswerte nach 1-MCP-Behandlung waren an Früchten beider Erntetermine, zu beiden Auslagerterminen sowohl unmittelbar bei Lagerende wie auch nach Shelf-life zu messen. Der Effekt von 1-MCP war bei `Elstar` im Kühllager größer als im ULO-Lager, da die CA-Bedingungen ihrerseits ebenfalls einen deutlichen Hemmeffekt aufwiesen. Bei `Pinova` zeigte die 1-MCP Behandlung nur im Kühllager Wirkung, nicht jedoch im CA- bzw. ULO-Lager (Abb. 11, 12), wo die Hemmung des

Festigkeitsverlustes bereits so ausgeprägt war, dass 1-MCP keine zusätzliche Wirkung mehr zeigen konnte. Im darauffolgenden Jahr (Versuch 5) konnten die Ergebnisse aus dem ersten Versuchsjahr bestätigt werden (Tab. 12). Insgesamt war in beiden Jahren der Unterschied zwischen 1-MCP behandelten und unbehandelten Kontrollfrüchten bei `Elstar` größer als bei `Pinova`. Während im Anschluss an die ULO-Lagerung die unbehandeltete Kontrolle bei `Elstar` deutlich an Festigkeit verlor, war bei `Pinova` nach CA- bzw. ULO-Lagerung keine Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit zu beobachten (Abb. 21, 23).

Auch in den Untersuchungen mit Ca-Infiltrationen (Versuch 2) wirkte sich 1-MCP positiv auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit aus. So waren zu beiden Auslagerterminen die 1-MCP behandelten Äpfel im Durchschnitt deutlich fester als die Früchte ohne 1-MCP (Tab. 15). Der Effekt der 1-MCP Behandlung war im Kühllager stärker als im CA-Lager. Abb. 26 (Kapitel 4.1.6) zeigt die Fruchtfleischfestigkeit 1-MCP behandelter sowie unbehandelter Früchte in Kombination mit und ohne Ca-Infiltration zur Ernte sowie nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung. Im CA-Lager zeigte sich zu diesem Zeitpunkt der Effekt der 1-MCP Behandlung erst während des Shelf-lifes. Unmittelbar nach der Lagerung war zwischen den Varianten kein Unterschied festzustellen. Nach dem Kühllager hingegen waren bereits zur Auslagerung die Früchte ohne 1-MCP und ohne Calcium deutlich weicher als die restlichen Varianten. An den Ca-infiltrierten Äpfeln war bei `Elstar` kein Unterschied zwischen 1-MCP behandelten und unbehandelten Äpfeln zu sehen, da die Ca-Infiltration einen mit der 1-MCP Behandlung vergleichbaren Effekt auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` bewirkte. Bei der zweiten Auslagerung nach 9 Monaten Lagerung zeigten die 1-MCP-Varianten bei den Früchten aus dem Kühllager nur in Kombination mit Calcium deutlich höhere Festigkeitswerte, wobei auch an diesen während des Shelf-lifes ein starker Verlust an Festigkeit zu beobachten war. Die 1-MCP behandelten Früchte ohne Calcium unterschieden sich hier nicht von den anderen Varianten: Nach 9 Monaten CA-Lager waren die 1-MCP Früchte deutlich fester als die anderen Varianten, und allein bei der Kombination 1-MCP plus Calcium blieben während der Shelf-life-Phase die hohen Festigkeitswerte erhalten (Abb. 27) (weiteres zur Wirkung von Calcium siehe Kapitel 4.1.6).

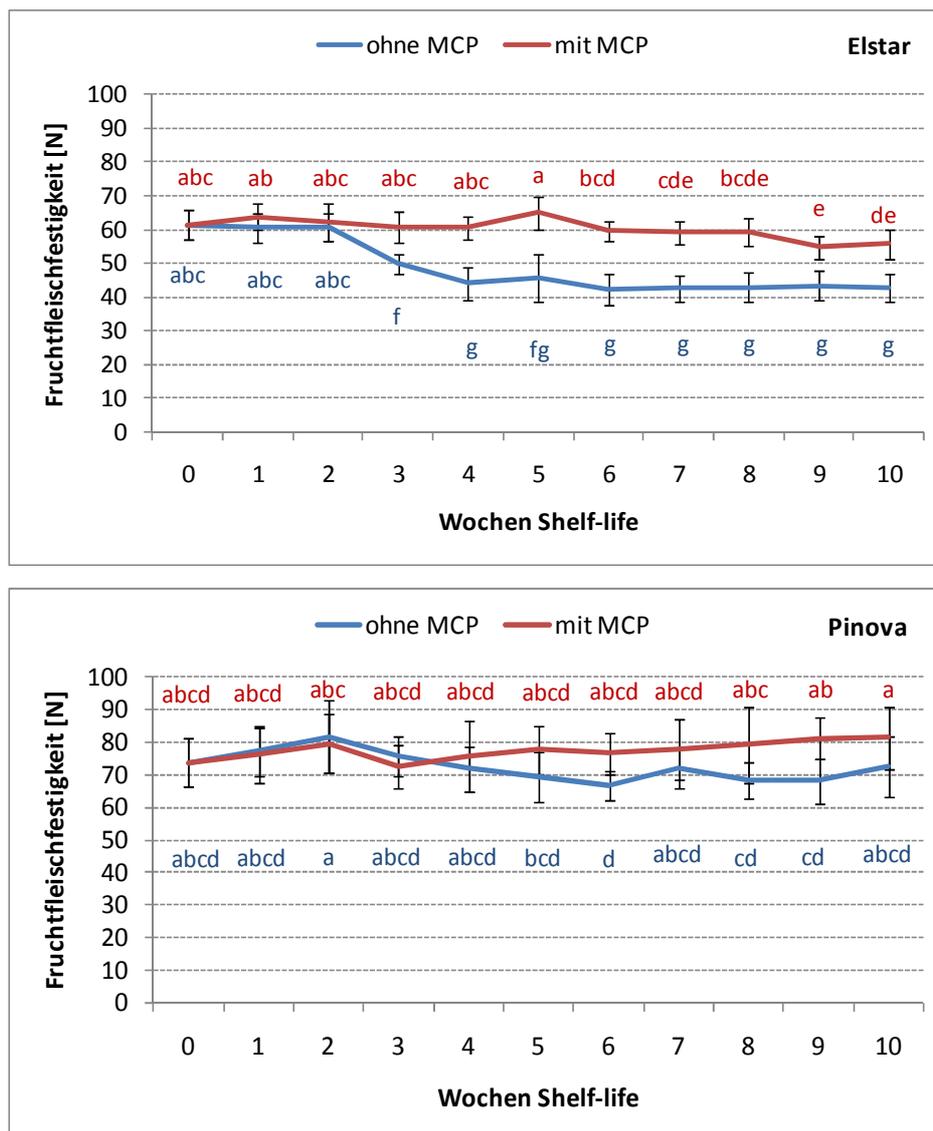


Abbildung 24: Änderung der Fruchtfleischfestigkeit bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten 'Elstar' und 'Pinova' Äpfeln während 10 Wochen Shelf-life bei 10°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an (Versuch 4: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

Abbildung 24 stellt die Änderung der Fruchtfleischfestigkeit bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten 'Elstar' und 'Pinova' Äpfeln während 10 Wochen Shelf-life bei 10°C dar. Sowohl die Dauer der Shelf-life Phase wie auch die Behandlung mit 1-MCP hatten hoch signifikanten Einfluss auf das Weichwerden der Äpfel. Bei 'Elstar' zeigte die Kontrollvariante einen deutlichen Rückgang der Fruchtfleischfestigkeit, vor allem zwischen Woche 2 und Woche 4. Anschließend nahmen die Werte nur noch geringfügig ab. Die 1-MCP behandelten Äpfel hingegen verloren während der gesamten Shelf-life-Phase kaum an Festigkeit. Der

Festigkeitsverlust von Lagerbeginn bis zur 10. Woche betrug bei diesen 5,7 N, während bei der Kontrollvariante ein Unterschied von 18,8 N gemessen wurde (keine tabellarische Darstellung der Werte). Im Vergleich zu `Elstar` zeigte sich `Pinova` deutlich stabiler. Zwar konnten auch hier an den 1-MCP behandelten Früchten ab Woche 4 höhere Penetrometerwerte gemessen werden als an den Kontrollfrüchten, jedoch betrug bei letzteren die Differenz zwischen Woche 0 und Woche 10 lediglich 1,3 N.

In den Untersuchungen zum Einfluss der Lagertemperatur (Versuch 8: 2009/2010) zeigte die 1-MCP Behandlung bei beiden Sorten einen inhibierenden Effekt auf das Weichwerden der Früchte, wobei der Unterschied zwischen 1-MCP behandelten und unbehandelten Früchten bei `Elstar` wiederum deutlich größer war als bei `Pinova` (Abb. 25). Bei `Elstar` waren in allen drei Temperaturvarianten die 1-MCP behandelten Äpfel deutlich fester als die Kontrollfrüchte. Bei `Pinova` konnte dies nur an den bei 3°C und bei 6°C gelagerten Früchten beobachtet werden. In den Varianten mit 1°C ergaben sich dagegen keine Unterschiede (weiteres siehe Kapitel 4.1.4).

Die Versuche mit Ethylenbehandlungen ergaben nur in 2007/2008 (Versuch 3) einen positiven Effekt der 1-MCP Applikation auf die Fruchtfleischfestigkeit (Tab. 16). Bei der sechs monatigen Lagerdauer im darauffolgenden Jahr (Versuch 6) war dies nicht der Fall.

4.1.5 Einfluss der Temperatur

Abbildung 25 zeigt die Veränderung der Fruchtfleischfestigkeit bei 1-MCP behandelten bzw. unbehandelten Früchten der Sorten `Elstar` und `Pinova` während 11 Wochen Lagerung bei 1°C, 3°C bzw. 6°C. Auf die graphische Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht wegen verzichtet. Bei beiden Sorten hatte die Temperatur hoch signifikanten Einfluss auf den Festigkeitsverlust, wobei die bei 1°C gelagerten Äpfel fester waren als die 3°C und 6°C Varianten. Letztere unterschieden sich bei keiner der beiden Sorten voneinander (Tab. 13).

Tabelle 13: Mehrfaktorielle Varianzanalyse zum Einfluss von 1-MCP, Temperatur und Lagerdauer auf die Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` und `Pinova` während einer elf wöchigen Lagerung bei 1°C, 3°C und 6°C (Versuch 8: 2009/2010; $p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Elstar: Festigkeit [N]			Pinova: Festigkeit [N]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
1-MCP	ohne	**	52,5	b	**	64,1	a
	mit		63,2	a		67,5	a
Temperatur	1°C		59,8	A		66,6	A
	3°C	**	57,2	B	**	65,9	AB
	6°C		56,7	B		64,9	B
Dauer [Wochen]	1		65,2	a		68,5	a
	2		64,1	ab		67,4	ab
	3		63,8	ab		68,3	ab
	4		62,0	b		65,5	bd
	5		58,8	c		67,2	abc
	6	**	58,8	c	**	65,7	abcd
	7		54,4	d		65,6	abcd
	8		54,3	d		63,2	d
	9		53,4	de		64,3	d
	10		51,3	ef		64,7	cd
	11		50,6	f		63,2	d

Tabelle 14: Wechselwirkung zwischen Lagertemperatur und 1-MCP Behandlung auf die Fruchtfleischfestigkeit von `Elstar` und `Pinova` während 11 Wochen Lagerung. (Versuch 8: 2009/2010; $p \leq 0,05$).

Sorte	Lagertemperatur	1-MCP	Fruchtfleischfestigkeit [N]	Sign.
Elstar	1°C	ohne	56,0	a
	3°C	ohne	50,8	b
	6°C	ohne	50,8	b
	1°C	mit	63,6	A
	3°C	mit	63,6	A
	6°C	mit	62,5	A
Pinova	1°C	ohne	65,7	a
	3°C	ohne	63,9	ab
	6°C	ohne	62,7	a
	1°C	mit	67,5	A
	3°C	mit	67,8	A
	6°C	mit	67,0	A

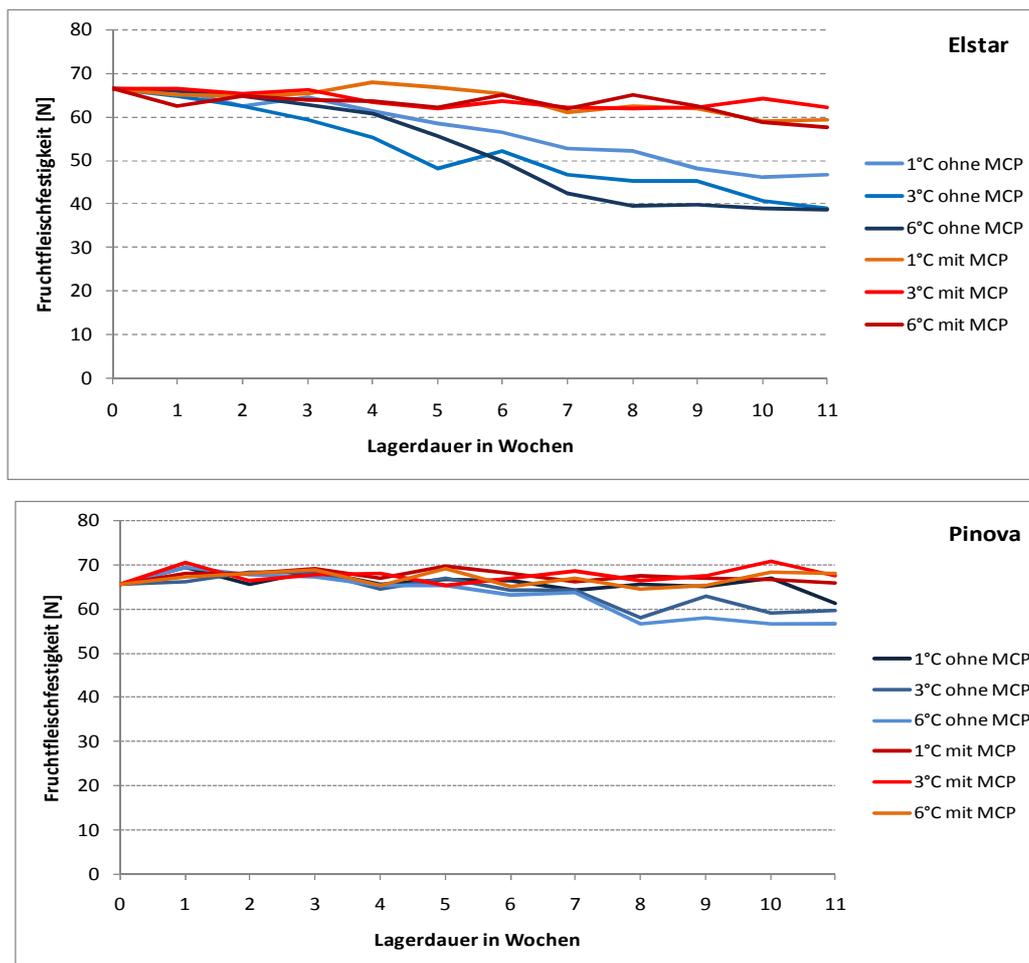


Abbildung 25: Veränderung der Fruchtfleisefestigkeit bei 1-MCP behandelten bzw. unbehandelten Früchten der Sorten `Elstar` und `Pinova` während 11 Wochen Lagerung bei 1°C, 3°C bzw. 6°C. (Versuch 8: 2009/2010).

Zwischen den Faktoren Temperatur und 1-MCP Behandlung bestanden bei beiden Sorten Wechselwirkungen (Tab. 14). So hatte bei den 1-MCP behandelten Früchten beider Sorten die Temperatur keinen Einfluss auf den Festigkeitsabbau.

Die `Elstar` Kontrollfrüchte (ohne 1-MCP) zeigten einen deutlichen Verlust der Festigkeit während der Lagerung (Abb. 25). Mit höheren Temperaturen wurden dabei die Äpfel schneller weich. An den 1-MCP behandelten Früchten hingegen nahm die Festigkeit über die gesamte Lagerdauer hinweg nur in geringem Maße ab. Unterschiede zwischen den Temperaturen konnten hier nicht beobachtet werden. Anders als bei `Elstar` zeigten sich bei `Pinova` auch die Kontrollfrüchte während der Lagerung sehr stabil (Abb. 25). Erst ab einer Lagerdauer von ca. 7 Wochen verloren die beiden wärmer gelagerten Varianten (3°C, 6°C)

leicht an Festigkeit. Die bei 1°C gelagerte Kontrollvariante unterschied sich nicht von den 1-MCP behandelten Früchten.

4.1.6 Einfluss von Calcium

Die Ca-Infiltrationen an `Elstar` hatten nach 4,5 sowie nach 9 Monaten Lagerung einen positiven Effekt auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit (Tab. 15), wobei dieser bei den Früchten im Kühllager deutlicher ausgeprägter war als im ULO-Lager.

Tabelle 15: Mehrfaktorielle Varianzanalyse zum Einfluss von Ca-Infiltration, Lagermethode, 1-MCP sowie Nachlagerung (7 Tage Shelf-life bei 20°C) auf die Fruchtfleischfestigkeit der Sorte `Elstar` nach 4,5 Monaten sowie nach 9 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung (Versuch 2: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Fruchtfleischfestigkeit [N]					
		Auslag. 1 (4,5 Monate)			Auslag. 2 (9 Monate)		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Calcium	ohne Ca ²⁺	**	56,7	b	**	38,5	b
	mit Ca ²⁺		64,6	a		47,0	a
Lagermethode	Kühllager	n.s.	60,4	A	**	41,2	B
	CA-Lager		60,8	A		44,3	A
1-MCP	ohne	**	52,8	b	**	37,5	b
	mit		68,5	a		48,0	a
Shelf-life	ohne	**	64,3	B	**	44,6	A
	mit		56,9	A		40,9	B

Zum ersten Auslagertermin nach 4,5 Monaten Lagerdauer konnten deutliche Wechselwirkungen zwischen der Lagermethode, 1-MCP sowie der Ca-Behandlung festgestellt werden. So unterschieden sich die mit Calcium infiltrierten von den Kontrollfrüchten im Kühllager nur bei den Äpfeln ohne 1-MCP, nicht jedoch bei den 1-MCP behandelten Früchten. Da die 1-MCP-Varianten bis zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Ernte nicht an Festigkeit verloren, konnte Calcium bei diesen Früchten keine zusätzliche Wirkung bringen (Abb. 26). Ähnlich war im CA-Lager zu diesem Zeitpunkt keine zusätzliche Wirkung der Ca-Infiltration zu erkennen. Bei der zweiten Auslagerung nach 9 Monaten (Abb. 27)

konnte hingegen nur an den 1-MCP Varianten eine Ca-Wirkung beobachtet werden, nicht jedoch an den Kontrollfrüchten ohne 1-MCP. Diese Wirkung der Calcium-Behandlung zeigte sich zudem an den Früchten aus dem Kühllager nur unmittelbar im Anschluss an die Lagerung, nicht jedoch nach dem Shelf-life, wogegen an den CA-Varianten ausschließlich nach dem Shelf-life entsprechende Unterschiede auftraten.

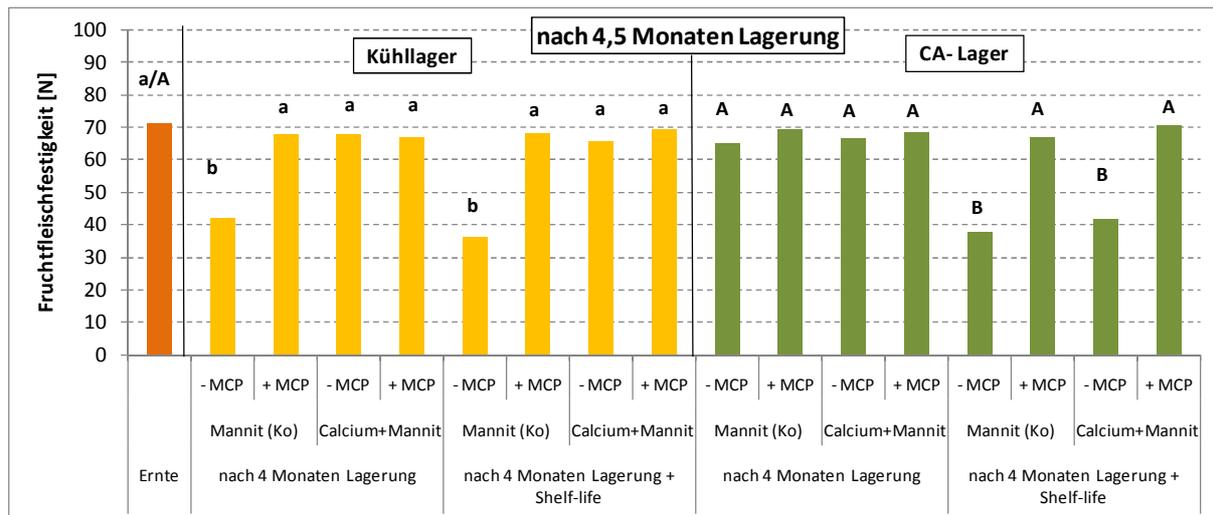


Abbildung 26: Fruchtfleischfestigkeit 1-MCP behandelter sowie unbehälter Früchte der Sorte 'Elstar', in Kombination mit Calcium + Mannit bzw. nur Mannit zur Ernte sowie nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung (Versuch 2: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

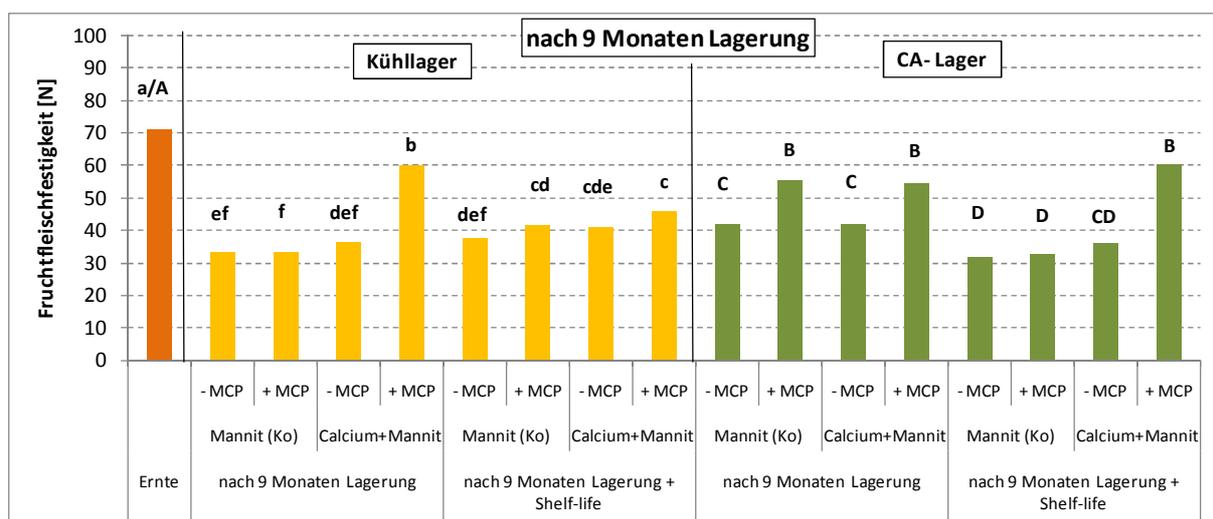


Abbildung 27: Fruchtfleischfestigkeit 1-MCP behandelter sowie unbehälter Früchte der Sorte 'Elstar', in Kombination mit Calcium + Mannit bzw. nur Mannit zur Ernte sowie nach 9 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung (Versuch 2: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

4.1.7 Einfluss von Ethylen

Die Ethylenbehandlungen zur Förderung der Fruchtreife zeigten bei `Elstar` in den beiden ersten Versuchsjahren keinen Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit, wie in den Tabellen 16 und 17 zu sehen ist. Die Bezeichnung `Dauerethylen` beschreibt in der Tabelle die Variante, bei der während der Lagerung in regelmäßigen Abständen Ethylen appliziert wurde. Bei Shelf-life-Ethylen hingegen erfolgte bei Beginn der Nachlagerung eine einmalige Ethylenbehandlung (siehe Kapitel 3.4.5). Auch bei `Golden Delicious` konnte keine Auswirkung der Ethylenbehandlungen auf die Festigkeit beobachtet werden (Abb. 28). Auf weitere Ausführungen dazu wird deshalb im Folgenden verzichtet.

Tabelle 16: Mehrfaktorielle Variananalyse zum Einfluss von Ethylenbehandlung, Erntetermin, Lagerdauer und 1-MCP auf die Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` (Versuch 3: 2007/2008) ($p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Fruchtfleischfestigkeit [N/cm ²]		
		Auslagerung 1		
		Einfluss	Mittel	Sign.
Ethylen- behandlung	ohne Ethylen		61,29	a
	Dauerethylen	n.s.	60,52	a
	Shelf-life Ethylen		61,14	a
Ernte- termin	Ernte 1 (normal)	**	65,19	a
	Ernte 2 (spät)		56,78	b
Lager- dauer	Auslag. 1 (4,5 Monate)	**	62,29	a
	Auslag. 2 (9 Monate)		59,67	b
1-MCP	ohne	**	51,41	b
	mit		70,56	a

Tabelle 17: Mehrfaktorielle Variananalyse zum Einfluss von Ethylenbehandlung, Erntetermin und 1-MCP auf die Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` nach 6 Monaten Lagerung (Versuch 6: 2008/2009) ($p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Fruchtfleischfestigkeit [N/cm ²]		
		Auslagerung 1		
		Einfluss	Mittel	Sign.
Ethylen- behandlung	ohne		62,76	a
	mit	n.s.	62,54	a
Ernte- termin	Ernte 1 (normal)	**	64,56	a
	Ernte 2 (spät)		60,74	b
1-MCP	ohne	n.s.	62,16	a
	mit		63,13	a

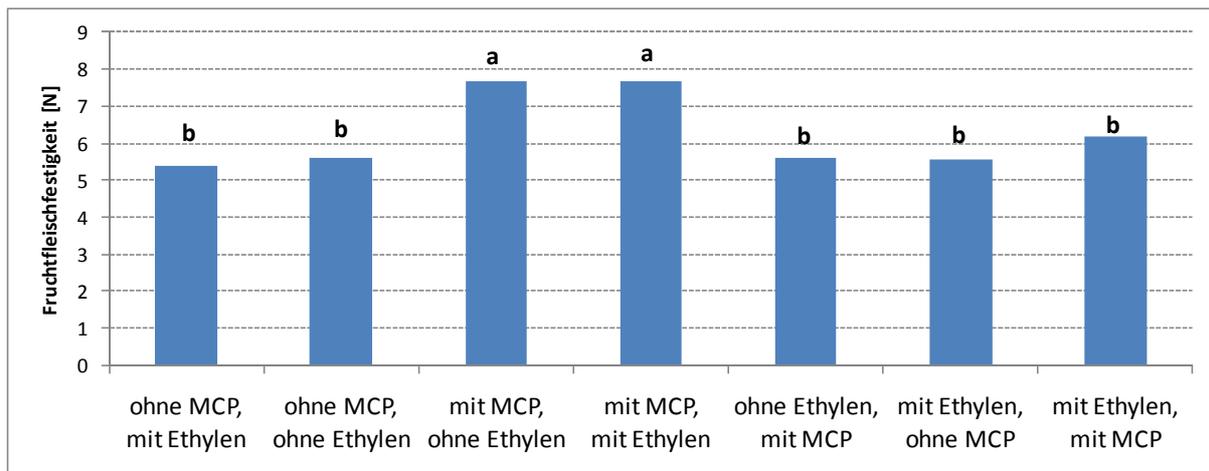


Abbildung 28: Einfluss von 1-MCP und Ethylenbehandlung in Kombination bzw. einzeln auf die Fruchtfleisfestigkeit bei 'Golden Delicious' nach 12 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 9: 2010; $p \leq 0,05$).

4.2 Einflussfaktoren auf die Fruchtreife

Das folgende Kapitel beschreibt die Ergebnisse zum Einfluss von Erntetermin, Lagermethode, 1-MCP, Calcium sowie Ethylen auf die Fruchtreife der beiden Apfelsorten 'Elstar' und 'Pinova'. Die Tabellen 18 - 26 zeigen die Ergebnisse mehrfaktorieller Varianzanalysen zum Einfluss der verschiedenen Faktoren auf die CO₂- sowie Ethylenproduktion. Zusätzlich zur tabellarischen Darstellung der Mittelwerte sowie der Ergebnisse der statistischen Auswertungen dienen Liniendiagramme zur besseren Vorstellung des Verlaufs der klimakterischen Respiration bzw. Ethylenbildung während des Shelf-lifes.

4.2.1 Einfluss der Sorte

Abbildung 29 zeigt die Ethylenproduktion der Sorten 'Elstar' und 'Pinova' während 8 Tagen Shelf-life bei 20°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte (Versuch 5: 2008/2009). Die Höhe der anfänglichen Menge an produziertem Ethylen war bei beiden Sorten in etwa gleich. Während die Kontrollfrüchte bei 'Elstar' ab ca. 6 Tagen nach Beginn der Nachlagerung einen deutlichen Anstieg in der Ethylenabgabe aufwiesen, nahm diese bei den Kontrollfrüchten von 'Pinova' während des Shelf-lifes ab. Die behandelten Varianten sowohl bei 'Elstar' wie auch bei Pinova' zeigten als Reaktion auf die 1-MCP-Behandlung einen starken Rückgang der

Ethylenproduktion, so dass bei Ende der Nachlagerperiode bei beiden Sorten kein Ethylen mehr messbar war.

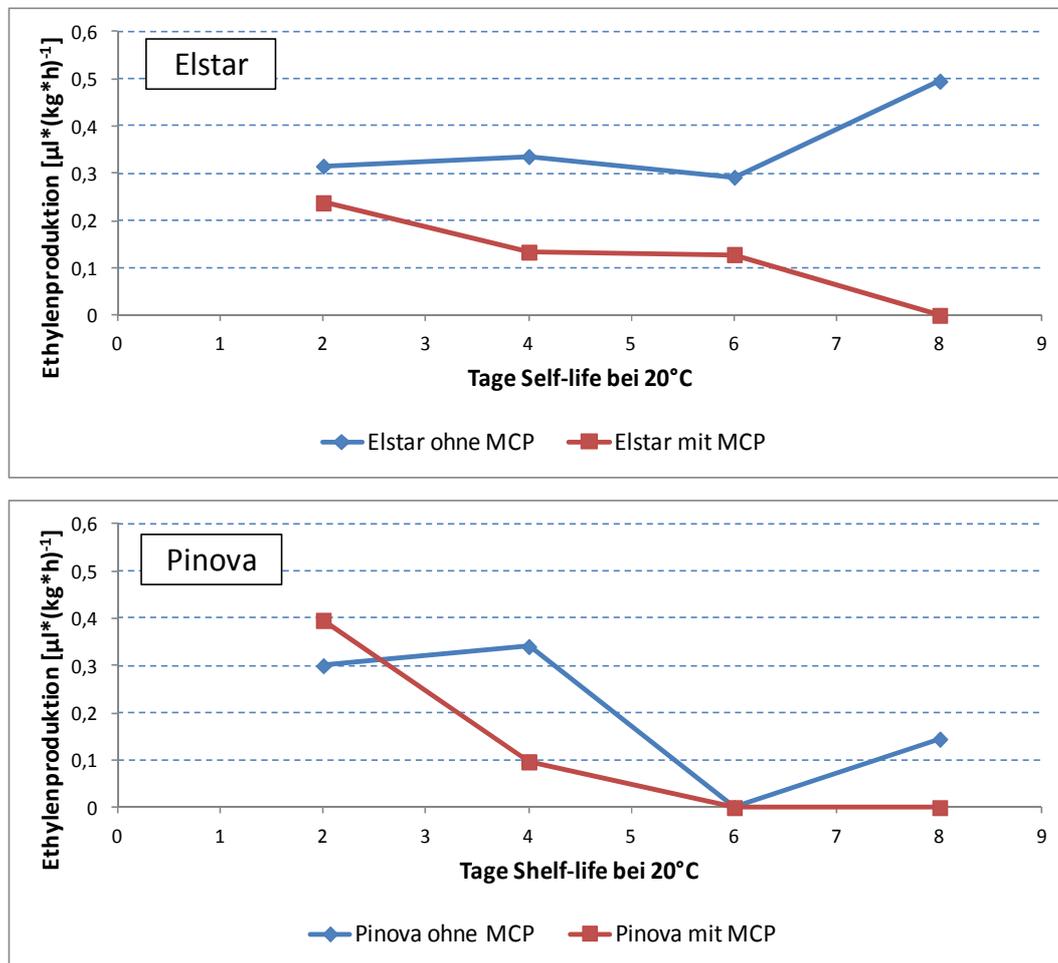


Abbildung 29: Ethylenproduktion von `Elstar` und `Pinova` während 8 Tagen Shelf-life bei 20°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte (Versuch 5: 2008/2009).

Der Verlauf der CO_2 -Produktion während 8 Tagen Shelf-life bei 20°C verlief bei den `Elstar` wie auch `Pinova` Äpfeln vom selben Versuch fast identisch (Abb. 30): Bei beiden Sorten nahm sowohl in den behandelten wie auch in den unbehandelten Äpfeln die CO_2 -Produktion nahezu linear ab. Nach 1-MCP-Anwendung sank die Respirationsrate gegenüber den Kontrollfrüchten um ca. 1/3.

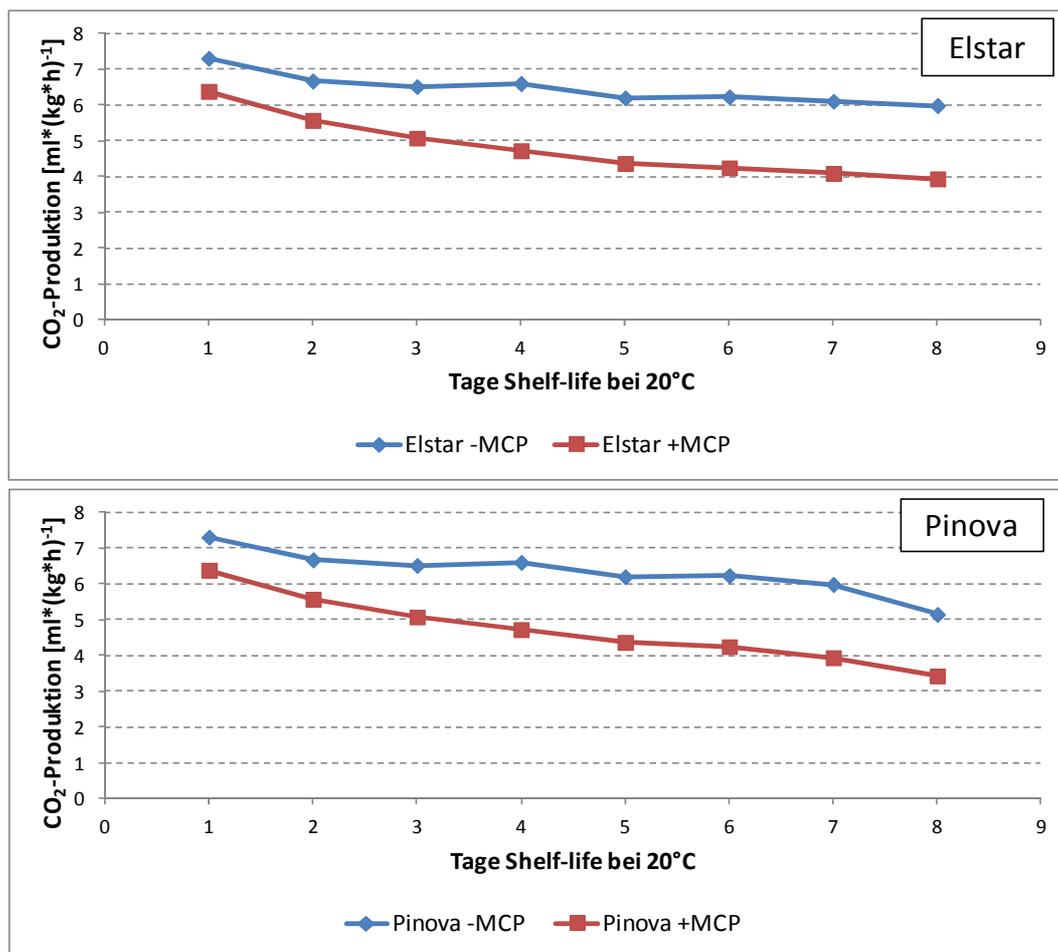


Abbildung 30: CO₂-Produktion von 'Elstar' und 'Pinova' während 8 Tagen Shelf-life bei 20°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte (Versuch 5: 2008/2009).

Abbildung 31 A und B zeigen die Ethylen- sowie die CO₂-Produktion der Sorten 'Elstar' und 'Pinova' ebenfalls nach dem Shelf-life bei 20°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte von Versuch 1 (2007/2008), bei dem jeweils 2 Erntetermine in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP getestet wurden. Bezüglich der Ethylenproduktion ergab eine einfaktorische Varianzanalyse zwar einen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten, jedoch konnte ein anschließender Bonferroni-Test zwischen den einzelnen Mittelwerten keine Signifikanzen bestätigen. Wie Abb. 31 A jedoch zeigt, konnte zumindest bei 'Elstar' tendenziell eine inhibierende Wirkung von 1-MCP auf die Ethylenbildung von Früchten beider Erntetermine beobachtet werden. 'Pinova' wies insgesamt eine etwas niedrigere Ethylenabgabe auf als 'Elstar', die 1-MCP-Applikation hatte hier unmittelbar nach der Ernte keinen deutlichen

Effekt. Insgesamt war bei beiden Sorten die Ethylenproduktion sehr niedrig bzw. bei einzelnen Varianten nicht messbar.

Betrachtet man die CO₂-Produktion beider Sorten (Abb. 31 B), so zeigt sich ein in etwa vergleichbares Niveau der Respirationsrate. Bei beiden Sorten wurde die Fruchtatmung signifikant durch 1-MCP gehemmt.

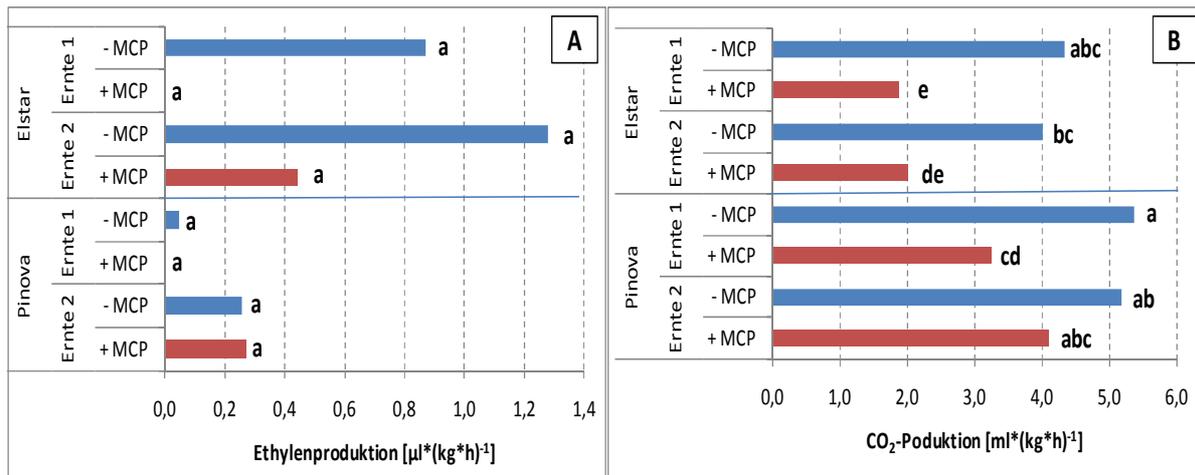


Abbildung 31: Ethylen- (A) sowie CO₂-Produktion (B) von 'Elstar' und 'Pinova' nach 10 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

4.2.2 Einfluss des Erntetermins

Im Versuch 1 (2007/2008) zeigte sich bei 'Elstar' kein Einfluss des Erntetermins auf die Respiration. Jedoch war bezüglich der Ethylenabgabe der Früchte beim zweiten Auslagertermin nach 9 Monaten Lagerung ein hochsignifikanter Einfluss des Erntetermins vorhanden, wobei Früchte der ersten Ernte mehr Ethylen produzierten als Äpfel des zweiten Erntetermins. Zwischen Erntetermin, Lagermethode und 1-MCP-Behandlung waren dabei hochsignifikante Wechselwirkungen festzustellen. Die beiden Erntetermine unterschieden sich nur im Kühllager sowie nur an Äpfeln ohne 1-MCP voneinander.

Bei 'Pinova' hatte der Erntetermin nur bei der ersten Auslagerung (nach 4,5 Monaten) Einfluss auf die Fruchtatmung. Hier bildeten die später geernteten Äpfel während der Nachlagerung mehr CO₂ als die vom ersten Erntetermin. Bei längerer Lagerdauer (9 Monate) war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. Bezüglich der Ethylenproduktion konnten bei

`Pinova` keine Unterschiede zwischen den beiden Ernteterminen festgestellt werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Einfluss von Erntetermin, Lagermethode und 1-MCP- Applikation auf die CO₂- und Ethylenproduktion bei `Elstar` und `Pinova` zu zwei Auslagerterminen nach 4.5 und 9 (`Elstar`) bzw. 4 und 8 (`Pinova`) Monaten Lagerung (Versuch 1: 2007/2008).

Sorte	Faktor	Variante	CO ₂ -Produktion [ml*(kg*h) ⁻¹]						Ethylenproduktion [µl*(kg*h) ⁻¹]					
			Auslagerung 1			Auslagerung 2			Auslagerung 1			Auslagerung 2		
			Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Elstar	Ernte	Ernte 1		4,62	a		5,50	a		0,58	a		20,58	a
		Ernte 2	n.s.	4,75	a	n.s.	5,53	a	n.s.	1,17	a	**	15,13	b
	Lagermethode	Kühlager		5,47	A		6,81	A		1,57	A		35,57	A
		CA (3°C)	**	-	-	**	-	-	**	-	-	**	-	-
		ULO		3,90	B		4,22	B		0,18	B		0,14	B
	1-MCP	ohne	**	5,60	a	**	6,78	a	**	1,54	a	**	35,38	a
mit			3,77	b		4,25	b		0,21	b		0,33	b	
Pinova	Ernte	Ernte 1	**	4,46	a	n.s.	4,18	a	n.s.	1,81	a	n.s.	5,01	a
		Ernte 2		5,09	a		4,25	a		1,73	a		4,36	a
	Lagermethode	Kühlager		5,83	A		5,37	A		4,94	A		13,47	A
		CA (3°C)	**	4,41	B	**	3,76	B	**	0,28	B	**	0,51	B
		ULO		4,10	B		3,53	B		0,10	B		0,07	B
	1-MCP	ohne	**	5,52	a	**	4,76	a	**	3,32	a	**	9,08	a
mit			4,04	b		3,68	b		0,22	b		0,28	b	

In Untersuchungen zur Wirkung von Ethylenbehandlungen bei `Elstar` hingegen (Tabellen 24 und 26) war bei allen Analysenterminen ein mindestens signifikanter Einfluss des Erntetermins sowohl auf die Fruchtatmung wie auch die Ethylenbildung zu sehen. Der spätere Erntetermin führte dabei durchschnittlich zu höherer CO₂- sowie Ethylenbildung während der Shelf-life Phasen im Vergleich zur früheren Ernte. In 2007/2008 konnten dabei bei beiden Sorten im Anschluss an die zweite Auslagerung nur an den Kontroll-Früchten, jedoch nicht bei den 1-MCP behandelten Äpfeln Unterschiede zwischen den Ernteterminen bezüglich der Ethylenproduktion festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich zur ersten Auslagerung in Bezug auf die Respiration. Hier waren an Äpfeln des ersten Erntetermins ebenfalls nur bei den Varianten ohne 1-MCP geringere CO₂-Werte zu beobachten.

In 2007/2008 (Versuch 3) bestand zur zweiten Auslagerung eine Wechselwirkung zwischen dem Einfluss von Erntetermin und Ethylen-Behandlungsvariante. Nur bei den Früchten mit Dauer-Ethylenbehandlung während der Lagerung waren Unterschiede zwischen den Ernteterminen zu erkennen (Kapitel 4.2.6).

4.2.3 Einfluss der Lagermethode

Die Lagermethode hatte bei beiden Sorten in den meisten Untersuchungen einen deutlichen Einfluss auf die CO₂-Produktion und Ethylenbildung der Äpfel. Wie die Tabellen 18 und 19 zeigen, war in 2007/2008 (Versuch 1) sowie in 2008/2009 (Versuch 5) bei beiden Auslagerterminen nach Kühllagerung eine deutlich höhere CO₂- sowie Ethylenbildung zu messen als nach ULO- bzw. CA-Lagerung, sowohl bei `Elstar` wie auch bei `Pinova`.

Tabelle 19: Einfluss von Lagermethode und 1-MCP-Applikation auf CO₂- und Ethylenproduktion bei `Elstar` und `Pinova` zu zwei Auslagerterminen nach ca. 4,5 und 8,5 (`Elstar`) bzw. 4 und 8 (`Pinova`) Monaten Lagerung (Versuch 5: 2008/2009).

Sorte	Faktor	Variante	CO ₂ -Produktion [ml*(kg*h) ⁻¹]						Ethylen-Produktion [µl*(kg*h) ⁻¹]					
			Auslagerung 1			Auslagerung 2			Auslagerung 1			Auslagerung 2		
			Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Elstar	Lagermethode	Kühllager	**	5,43	A	**	8,33	A	**	22,00	A	**	34,58	A
		ULO		2,92	B		4,03	B		0,08	B		0,38	B
	1-MCP	ohne	**	5,26	a	**	7,68	a	**	21,84	a	**	32,68	a
		mit		3,10	b		4,68	b		0,25	b		2,28	b
Pinova	Lagermethode	Kühllager	**	4,98	A	**	5,95	A	**	7,16	A	**	20,17	A
		ULO		3,09	B		3,50	B		0,11	B		0,09	B
	1-MCP	ohne	**	4,91	a	**	5,43	a	**	7,13	a	**	17,06	a
		mit		3,16	b		4,02	b		0,13	b		3,21	b

Bei `Pinova` war zwischen ULO-Lagerung bei 1°C und der CA-Lagervariante bei 3°C kein Unterschied festzustellen. Der Einfluss der Lagermethode war bei Früchten ohne 1-MCP Applikation deutlich ausgeprägter als bei den behandelten Varianten. So zeigte sich z.B. bei `Elstar` in 2007/2008 bei beiden Auslagerterminen eine deutlich geringere Ethylenproduktion

im Anschluss an die ULO-Lagerung im Vergleich zum Kühllager nur bei den Äpfeln ohne 1-MCP. Bei den 1-MCP Früchten war der hemmende Effekt durch die Behandlung bereits so groß, dass die ULO-Lagerung keinen zusätzlichen inhibierenden Effekt auf die Ethylenproduktion mehr hatte.

Abbildung 32 zeigt den Verlauf der Ethylenabgabe im Shelf-life bei `Elstar` im Anschluss an 9,5 Monate Lagerung. Nach Kühllagerung (A) war bei den Kontrollfrüchten ein deutlicher klimakterischer Anstieg der Ethylenproduktion zu sehen. Die ULO-Lagerung hingegen führte zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Ethylenbildung bei allen Varianten.

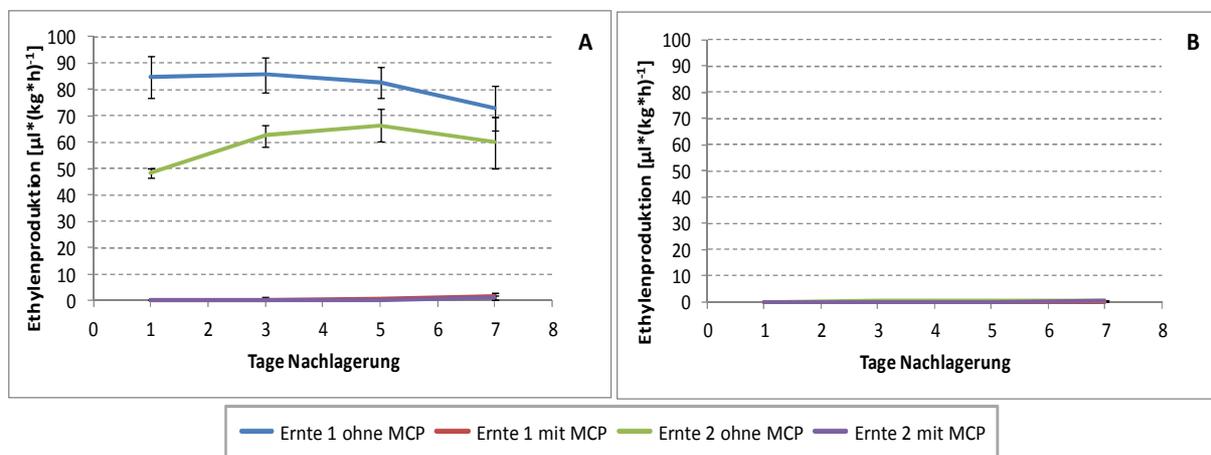


Abbildung 32: Ethylenproduktion der Sorte `Elstar` während 7 Tagen Nachlagerung bei 20°C im Anschluss an 9,5 Monate Kühllager (A) bzw. ULO-Lager (B). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an (Versuch 1: 2007/2008).

Bei `Pinova` war während der ersten Nachlagerung im Anschluss an 4,5 Monate Kühllagerung ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Ethylenproduktion bei den Kontrollfrüchten (ohne 1-MCP) zu beobachten, während bei den Varianten aus dem ULO-Lager die Ethylenbildung fast vollständig inhibiert wurde (Ergebnisse nicht dargestellt).

Abb. 33 zeigt den Verlauf der Ethylenproduktion bei `Pinova` nach 8 Monaten Lagerdauer. Die Unterschiede zwischen den mit und ohne 1-MCP-behandelten Früchten waren nach Kühllagerung sehr groß. Die Ethylenbildung während des Shelf-lifes nahm jedoch im Gegensatz zur früheren Auslagerung bei den Kontrollfrüchten ab. Nach CA- sowie nach ULO-Lagerung (dargestellt ist nur ULO-Lagerung, Abb.33 B) war weder ein Unterschied zwischen

den Ernteterminen noch zwischen 1-MCP- behandelten und Kontrollfrüchten zu erkennen. Bei allen Varianten erfolgte hier eine nahezu vollständige Inhibierung der Ethylenbildung.

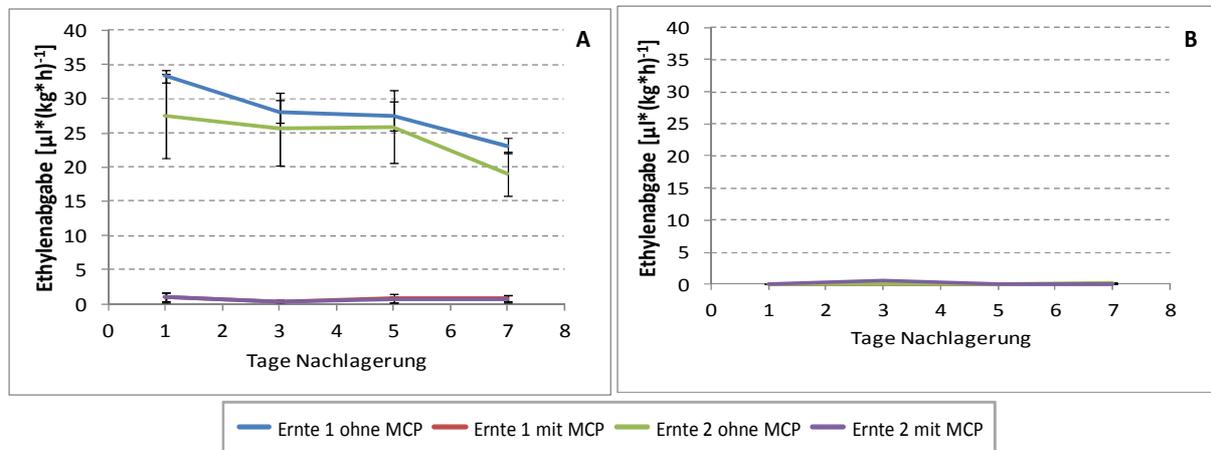


Abbildung 33: Ethylenproduktion der Sorte 'Pinova' während 7 Tagen Nachlagerung bei 20°C im Anschluss an 8 Monate Kühlager (A) bzw. ULO-Lager (B). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an (Versuch 1: 2007/2008).

Auch die Ergebnisse der Atmungsmessungen zeigten bei Pinova nach 8 Monaten Lagerung deutliche Unterschiede je nach Lagerart: Nach Kühlagerung gab es zwischen 1-MCP behandelten und den unbehandelten Äpfeln nahezu eine Halbierung der Atmungsintensität, wobei sich die Früchte der ersten und zweiten Ernte nicht unterschieden. Nach CA- bzw.-ULO-Lagerung (dargestellt sind nur die ULO-Varianten) waren die Unterschiede durch die 1-MCP-Behandlung nahezu aufgehoben und die Atmung verlief bei allen Behandlungen auf ähnlich tiefem Niveau.

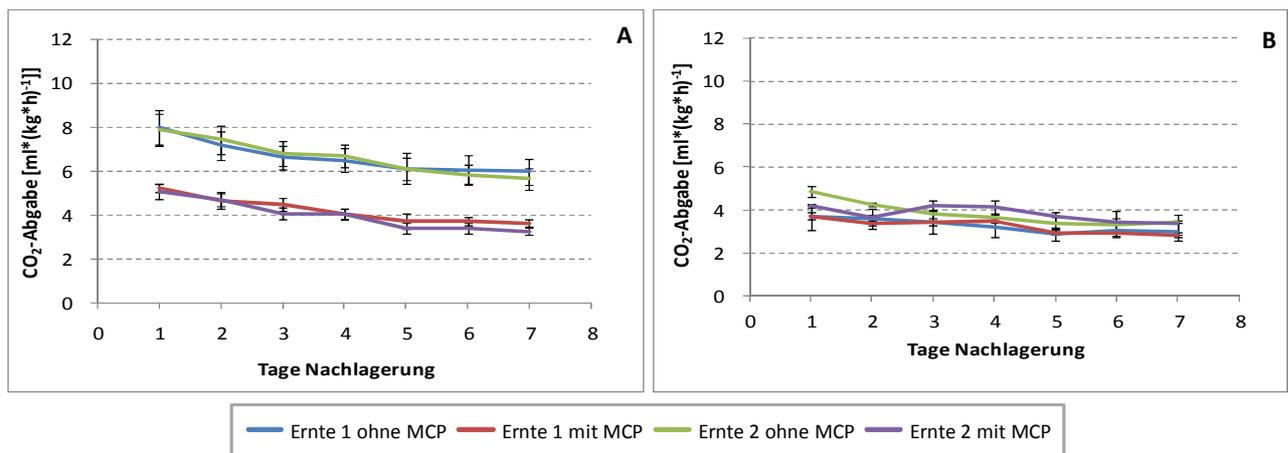


Abbildung 34: CO₂-Produktion der Sorte `Pinova` während 7 Tagen Nachlagerung bei 20°C im Anschluss an 8 Monate Kühllager (A) bzw. ULO-Lager (B). Die Fehlerindikatoren geben die Standard-abweichung an. (Versuch 1: 2007/2008).

In den Untersuchungen zum Einfluss von Calcium auf die Fruchtreife bei `Elstar` (Versuch 2, siehe Tabelle 22) bestätigten sich die zuvor gemachten Aussagen: nach Kühllagerung große Unterschiede in der Ethylenbildung und Atmungsintensität, dagegen nach CA- bzw. ULO-Lagerung relativ kleine Unterschiede im Atmungsverhalten und in der Ethylenabgabe.

4.2.4 Einfluss von 1-MCP

Die Applikation von 1-MCP führte in fast allen Versuchen zu einer deutlichen Verminderung der klimakterischen Respiration und Ethylenbildung bei beiden Sorten (Tabellen 18-24, 26). Dieser Effekt war jedoch im Kühllager deutlich stärker als im ULO bzw. CA-Lager. Zwischen Lagermethode und 1-MCP Applikation bestand in vielen Fällen eine klare Wechselwirkung, wie Tab. 20 exemplarisch am Beispiel der Sorte `Elstar` und `Pinova` (Versuch 1) zeigt. So war nur nach Kühllagerung, nicht jedoch nach ULO-Lagerung (sowie CA-Lagerung bei `Pinova`) ein signifikant inhibierender Effekt der 1-MCP Applikation auf CO₂- und Ethylenbildung festzustellen (siehe z.B. Abb. 32, 33). Aufgrund der bereits fast vollständigen Hemmung durch die CA/ULO-Bedingungen zeigte die 1-MCP Applikation hier keinen zusätzlichen Effekt.

Tabelle 20: Wechselwirkung zwischen Einfluss von Lagermethode und 1-MCP auf CO₂- und Ethylenproduktion. Mittelwerte der Ergebnisse für `Elstar` und `Pinova` nach 4 sowie 9,5 (`Elstar`) bzw. 8 (`Pinova`) Monaten Lagerung aus Versuch 1: 2007/2008, ($p \leq 0,05$).

Sorte	Lagermethode	1-MCP	CO ₂ -Produktion [ml(kg/h) ⁻¹]				Ethylen-Produktion [µl(kg/h) ⁻¹]			
			Auslagerung 1	Sign.	Auslagerung 2	Sign.	Auslagerung 1	Sign.	Auslagerung 2	Sign.
Elstar	Kühlager	ohne	6,86	a	8,95	a	2,83	a	70,53	a
	Kühlager	mit	4,08	b	4,66	b	0,32	b	0,60	b
	CA-Lager	ohne	/	/	/	/	/	/	/	/
	CA-Lager	mit	/	/	/	/	/	/	/	/
	ULO-Lager	ohne	4,35	b	4,61	b	0,25	b	0,22	b
	ULO-Lager	mit	3,45	b	3,83	b	0,11	b	0,07	b
Pinova	Kühlager	ohne	7,38	A	6,63	A	9,49	A	17,55	A
	Kühlager	mit	4,27	C	4,10	B	0,38	B	0,46	B
	CA-Lager	ohne	4,88	B	4,10	B	0,34	B	0,63	B
	CA-Lager	mit	3,93	C	3,42	C	0,22	B	0,05	B
	ULO-Lager	ohne	4,28	C	3,53	BC	0,12	B	0,03	B
	ULO-Lager	mit	3,92	C	3,52	BC	0,08	B	0,07	B

Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich in 2008/2009. Auch hier bestanden zu beiden Auslagerterminen hochsignifikante Wechselwirkungen zwischen Lagermethode und 1-MCP-Applikation. Nach dem Kühlager waren sowohl CO₂- wie auch Ethylenbildung der 1-MCP behandelten Früchte deutlich niedriger im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei den ULO-Varianten konnte dieser Einfluss zwar ebenfalls tendenziell beobachtet, jedoch nicht statistisch abgesichert werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Wechselwirkung zwischen Einfluss von Lagermethode und 1-MCP auf CO₂- und Ethylenproduktion. Mittelwerte der Ergebniss für `Elstar` und `Pinova` nach 4,5 und 8,5 (Elstar) bzw. 4 und 8 (`Pinova`) Monaten Lagerung (Versuch 5: 2008/2009) ($p \leq 0,05$).

Sorte	Lagermethode	1-MCP	CO ₂ -Produktion [ml(kg/h) ⁻¹]				Ethylen-Produktion [µl(kg/h) ⁻¹]			
			Auslagerung 1	Sign.	Auslagerung 2	Sign.	Auslagerung 1	Sign.	Auslagerung 2	Sign.
Elstar	Kühlager	ohne	7,42	a	10,98	a	43,62	a	64,86	a
	Kühlager	mit	3,44	b	5,68	b	0,37	b	4,31	b
	ULO-Lager	ohne	3,09	bc	4,38	c	0,05	b	0,51	b
	ULO-Lager	mit	2,75	c	3,68	c	0,12	b	0,24	b
Pinova	Kühlager	ohne	6,51	a	6,90	a	14,12	a	33,95	a
	Kühlager	mit	3,45	b	5,01	b	0,19	b	6,40	b
	ULO-Lager	ohne	3,31	b	3,96	c	0,14	b	0,16	b
	ULO-Lager	mit	2,88	b	3,03	c	0,07	b	0,02	b

In den Untersuchungen mit Ca-Infiltration (Versuch 2) führte 1-MCP ebenso zu einer deutlichen Inhibierung der Fruchtreife (Tabelle 22). Zu beiden Auslagerungen war sowohl die CO₂- wie auch die Ethylenbildung der 1-MCP Varianten deutlich niedriger als in den

Kontrollfrüchten, nach der Kühlagerung wie nach ULO-Lagerung. Nur zu Auslagerung 2 war nach dem ULO-Lager kein signifikanter Einfluss von 1-MCP auf die CO₂-Produktion festzustellen. Der Effekt der 1-MCP Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ohne 1-MCP, ohne Calcium) war im Kühllager deutlich größer als im CA-Lager, wie Abbildung 35 exemplarisch zeigt. Im Anschluss an die zweite Auslagerung nach 9 Monaten Lagerung war im Kühllager bei beiden Varianten ohne 1-MCP sowie bei der Kombination "Calcium mit 1-MCP" eine deutlich höhere Ethylenproduktion zu messen als bei den Früchten "ohne Calcium mit 1-MCP" (Ergebnisse nicht dargestellt).

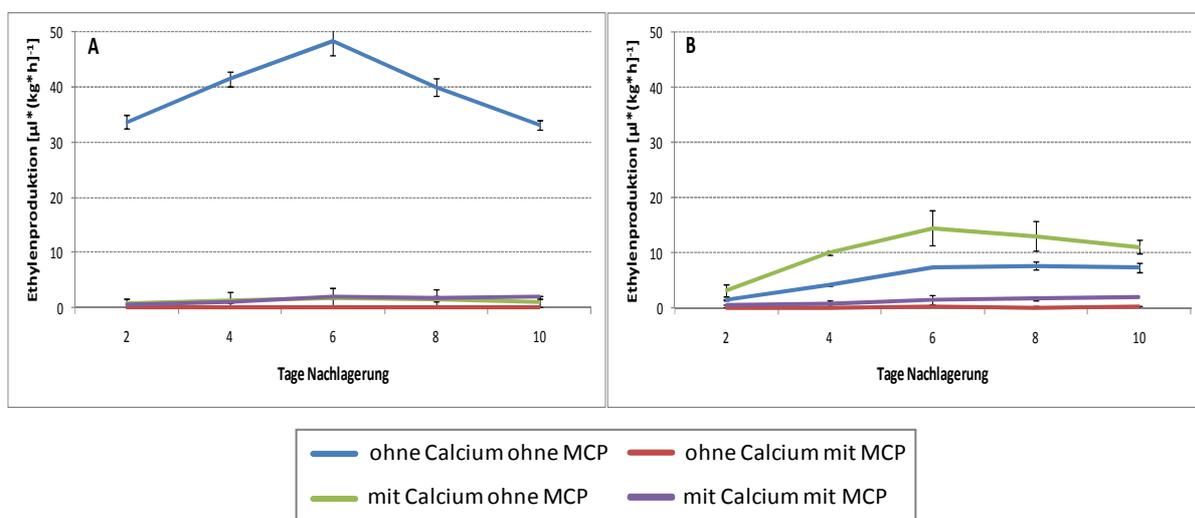


Abbildung 35: Ethylenproduktion Calcium-behandelter bzw. unbehandelter Äpfel der Sorte 'Elstar' in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP während 10 Tagen Shelf-life bei 20°C im Anschluss an 4,5 Monate Kühlager (A) bzw. CA-Lager (B).

Die CO₂-Produktion wurde sowohl im Kühl- wie auch im CA-Lager durch die Behandlung mit 1-MCP gehemmt, wobei die Kombination der beiden Behandlungen (Calcium mit 1-MCP) weniger Effekt hatte als 1-MCP alleine. Die inhibierende Wirkung von 1-MCP sowohl auf die Ethylenbildung wie auch auf die Respiration war zur ersten Auslagerung nach ca. 4,5 Monaten größer bei den Varianten ohne Calcium, nach ca. 9 Monaten jedoch bei den Calcium-infiltrierten Früchten (weiteres siehe 4.2.5).

Die Versuche zur Wirksamkeit von Ethylen-Behandlungen bei 'Elstar' zeigten in 2007/2008 ebenfalls einen deutlich inhibierenden Effekt von 1-MCP auf die Respiration sowie die Ethylenbildung (siehe Tabelle 24), wobei dieser mit späterer Ernte sowie längerer

Lagerdauer im Vergleich zu den Früchten ohne 1-MCP zunahm. In 2008/2009 hingegen wurde nur die Fruchtatmung, nicht jedoch die Ethylenbildung vermindert (Tabelle 26).

4.2.5 Einfluss von Calcium

Die Infiltration mit CaCl_2 hatte zu beiden Auslagerterminen einen hochsignifikanten Einfluss auf die Ethylenbildung der Früchte. Dabei war die Ethylenproduktion der Kontrollfrüchte (ohne Infiltration) während der Nachlagerungen deutlich höher als die der Ca-behandelten Äpfel (siehe Tab. 22). Zu beiden Auslagerungen konnten jedoch hochsignifikante Wechselwirkungen zwischen Lagermethode, 1-MCP und Calcium-Behandlung festgestellt werden.

Tabelle 22: Einfluss von Lagermethode, Ca-Infiltration und 1-MCP-Applikation auf die CO_2 - und Ethylenproduktion bei `Elstar` und `Pinova` zu zwei Auslagerterminen nach 4,5 sowie 9 Monaten (Versuch 2: 2007/2008).

Faktor	Variante	CO_2 -Produktion [$\text{ml} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$]						Ethylen-Produktion [$\mu\text{l} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$]					
		Auslagerung 1			Auslagerung 2			Auslagerung 1			Auslagerung 2		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Lagermethode	Kühlager	n.s.	5,48	a	**	7,09	a	**	10,52	a	**	47,73	a
	CA-Lager		5,83	a	**	5,74	b	**	4,40	b	**	8,43	b
Calcium	ohne CaCl_2	n.s.	5,68	A	*	6,76	A	**	11,30	A	**	38,29	A
	mit CaCl_2		5,63	A	**	6,07	B	**	3,62	B	**	17,86	B
1-MCP	ohne	**	6,72	a	**	7,29	a	**	14,17	a	**	38,90	a
	mit	**	4,60	b	**	5,54	b	**	0,75	b	**	17,25	b

Tabelle 23: Wechselwirkung zwischen Lagermethode, 1-MCP sowie Ca-Behandlung auf die Ethylenproduktion bei `Elstar` (Versuch 2: 2007/2008) ($p \leq 0,05$).

Lagermethode	1-MCP	Calcium	Mittelwert Auslag. 1 [$\mu\text{l}(\text{kg}/\text{h})^{-1}$]	Sign.	Mittelwert Auslag. 2 [$\mu\text{l}(\text{kg}/\text{h})^{-1}$]	Sign.
Kühlager	ohne	ohne	39,33	a	68,59	a
Kühlager	ohne	mit	1,27	cd	54,13	a
Kühlager	mit	ohne	0,02	d	65,13	a
Kühlager	mit	mit	1,44	cd	3,08	b
CA-Lager	ohne	ohne	5,68	c	19,07	b
CA-Lager	ohne	mit	10,40	b	13,82	b
CA-Lager	mit	ohne	0,16	d	0,40	b
CA-Lager	mit	mit	1,38	cd	0,42	b

Bei der frühen Auslagerung war im Kühllager nur an den Früchten ohne 1-MCP ein inhibierender Effekt der Ca-Behandlung zu beobachten. In den 1-MCP behandelten Früchten war sowohl im Kühl- wie auch im CA-Lager aufgrund der bereits starken Inhibierung kein zusätzlicher Effekt durch Calcium zu sehen. Bei den Äpfeln ohne 1-MCP führte im CA-Lager die Calciuminfiltration zu einem Anstieg der Ethylenbildung (siehe Tabelle 23). Nach der zweiten Auslagerung hingegen zeigten die 1-MCP behandelten Früchte ohne Calcium im Kühllager eine deutlich gestiegene Ethylenabgabe, wogegen die Kombination aus 1-MCP und Calcium zu einer starken Hemmung von Ethylen führte. An den Früchten ohne 1-MCP war zu diesem Termin sowohl bei den Kühl- wie auch bei den CA-Lager-Varianten zwar tendenziell ein inhibierender Effekt durch die Ca-Behandlung zu beobachten, jedoch konnten die Unterschiede statistisch nicht abgesichert werden.

Die Wirkung der Calciumbehandlung auf die Ethylenproduktion war insgesamt deutlich von der jeweiligen Lagermethode abhängig. Während im Kühllager die Ca-infiltrierten Früchte durchschnittlich eine niedrigere Ethylenproduktion während der Nachlagerung aufwiesen als die Kontrollfrüchte, war im CA-Lager kein inhibierender Effekt durch Calcium zu erkennen.

Insgesamt war der Einfluss der Ca-Infiltration auf die Ethylenproduktion deutlich größer als auf die Fruchtatmung. Zum frühen Auslagertermin waren bezüglich der CO₂-Produktion keine Unterschiede zwischen Ca-infiltrierten und nicht infiltrierten Früchten festzustellen. Bei später Auslagerung bestanden zwischen 1-MCP und Ca-Behandlung sowie zwischen Lagermethode und Ca-Behandlung Wechselwirkungen (Tabelle 22). Im CA-Lager zeigte die Ca-Infiltration keinen signifikanten Effekt. Zudem war nach den 9 Monaten Lagerung nur in den 1-MCP Varianten eine zusätzliche Wirkung von Ca auf die Respiration zu beobachten. An den Äpfeln ohne 1-MCP gab es keinen Unterschied.

4.2.6 Einfluss von Ethylen

Tabelle 24 und 26 zeigen den Einfluss von Ethylenbehandlung, Erntetermin und 1-MCP auf Atmung und Ethylenproduktion bei `Elstar` in den Jahren 2007/2008 bzw. 2008/2009. Insgesamt hatten die Ethylengaben nur geringe Wirkung. In 2007/2008 war nur nach 9 Monaten Lagerung (Auslagerung 2) ein Einfluss von Ethylen auf Respiration und Ethylen-

produktion festzustellen. Dabei wurde in der Variante mit "Dauerethylen" die höchste CO₂- sowie Ethylenbildung der Früchte während der Nachlagerung gemessen. Früchte ohne "Dauerethylen" und mit Ethylenbehandlung zu Shelf-life-Beginn unterschieden sich nicht voneinander.

Tabelle 24: Einfluss von Ethylenbehandlung, Erntetermin und 1-MCP auf Atmung und Ethylenproduktion bei 'Elstar' nach 4,5 sowie 9 Monaten ULO-Lagerung (Versuch 3: 2007/2008).

Faktor	Variante	CO ₂ -Produktion [ml*(kg*h) ⁻¹]						Ethylen-Produktion [µl*(kg*h) ⁻¹]					
		Auslagerung 1			Auslagerung 2			Auslagerung 1			Auslagerung 2		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Ethylenbehandlung	ohne Dauerethylen		3,65	a		4,21	a		0,05	a		0,66	b
	Dauerethylen	n.s.	4,21	a	*	5,25	b	n.s.	0,52	a	**	1,74	a
	Shelf-life Ethylen		4,04	a		4,45	ab		0,37	a		0,88	b
Ernte	Ernte 1	*	3,72	B	**	4,20	B	*	0,06	B	**	1,87	B
	Ernte 2		4,21	A		5,08	A		0,56	A		0,31	A
1-MCP	ohne	**	4,61	a	**	5,38	a		0,48	a	**	1,97	a
	mit		3,33	b		3,89	b	n.s.	0,15	a		0,21	b

Die Wechselbeziehungen zwischen den Faktoren Ethylenbehandlung, Erntetermin und 1-MCP erwiesen sich als signifikant. Nur bei Früchten des zweiten Erntetermins ohne 1-MCP führte die Variante "Dauerethylen" zu einer höheren Ethylen- sowie CO₂- Bildung im Vergleich zu den anderen Varianten (Tab. 25). In 2008/2009 konnte ebenfalls eine Wirkung der Ethylenbehandlung auf Respiration und Ethylenproduktion beobachtet werden, jedoch waren die Unterschiede sehr gering (Tab. 26).

Tabelle 25: Wechselwirkung zwischen Ethylen-Begasung, Erntetermin und 1-MCP auf CO₂- und Ethylenabgabe bei `Elstar` nach 9 Monaten Lagerung (Versuch 3: 2007/2008) ($p \leq 0,05$).

Ethylenvariante	Erntetermin	1-MCP	CO ₂ -Produktion [ml(kg/h) ⁻¹]		Ethylen-Produktion [µl(kg/h) ⁻¹]	
			Auslagerung 2	Sign.	Auslagerung 2	Sign.
ohne Dauerethylen	1	ohne	4,32	b	0,57	b
ohne Dauerethylen	1	mit	3,52	b	0,00	b
ohne Dauerethylen	2	ohne	4,47	b	1,71	b
ohne Dauerethylen	2	mit	4,52	b	0,35	b
Dauerethylen	1	ohne	4,82	b	0,83	b
Dauerethylen	1	mit	3,68	b	0,00	b
Dauerethylen	2	ohne	8,67	a	6,11	a
Dauerethylen	2	mit	3,85	b	0,02	b
Shelf-life Ethylen	1	ohne	4,84	b	0,48	b
Shelf-life Ethylen	1	mit	4,01	b	0,00	b
Shelf-life Ethylen	2	ohne	5,18	b	2,14	b
Shelf-life Ethylen	2	mit	3,78	b	0,90	b

Tabelle 26: Einfluss von Ethylenbehandlung Erntetermin und 1-MCP auf Atmung und Ethylenproduktion bei `Elstar` nach 6 Monaten Lagerung (Versuch 6: 2008/2009).

Faktor	Variante	CO ₂ -Produktion [ml*(kg*h)-1]			Ethylen-Produktion [µl*(kg*h)-1]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Ethylen- behandlung	ohne Ethylen	*	3,61	b	*	0,19	b
	mit Ethylen		3,78	a		0,29	a
Ernte	Ernte 1	**	3,45	B	**	0,15	B
	Ernte 2		3,93	A		0,32	A
1-MCP	ohne	**	3,89	a	n.s.	0,26	a
	mit		3,50	b		0,21	a

Die Abbildungen 36 und 37 zeigen die Ergebnisse der Versuche mit Ethylenbehandlung bei `Golden Delicious`. Die Bezeichnung in den Graphiken gibt die jeweiligen Behandlungen einzelner Varianten an. So bedeutet z.B. "mit Ethylen, mit MCP" dass die jeweiligen Früchte vor Beginn des Shelf-lifes (Termin 1) mit Ethylen sowie zusätzlich nach 3 Tagen Shelf-life (Termin 2) mit 1-MCP behandelt wurden. Nur bei "mit MCP, mit Ethylen" sowie "mit Ethylen, mit MCP" wurde ab Tag 9 zusätzlich eine tägliche Ethylen- Applikation durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.5.2).

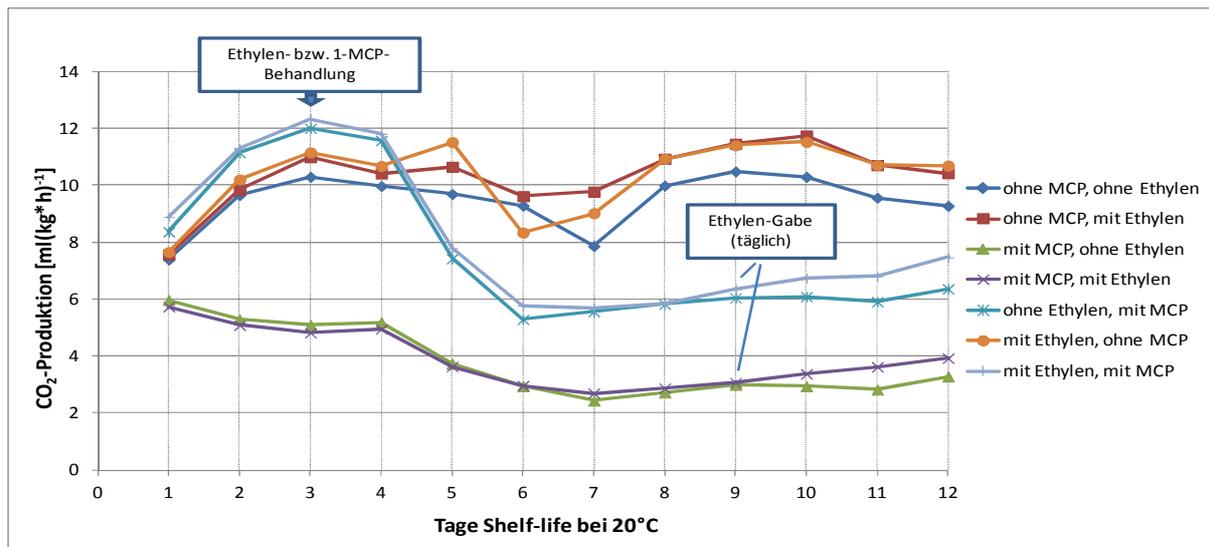


Abbildung 36: Einfluss von Ethylen- und 1-MCP-Behandlungen auf die CO₂-Produktion bei `Golden Delicious` während 12 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 9: 2010).

Bei den Früchten, die zu Termin 1 mit 1-MCP behandelt wurden, war während des Shelf-lifes eine deutliche Abnahme der Respiration zu verzeichnen. Alle anderen Varianten zeigten zu Beginn einen Anstieg der Fruchtatmung. Ein eindeutiger Effekt der anfänglichen Ethylenbehandlung konnte zu diesem Zeitpunkt nicht erkannt werden. Die Applikation von 1-MCP zu Termin 2 führte zu einer starken Abnahme der CO₂-Produktion, wobei auch hier zwischen den Varianten mit bzw. ohne Ethylen keine Unterschiede beobachtet werden konnten. Die Ethylenbehandlung zu Termin 2 zeigte verglichen mit der Kontrolle ("ohne MCP, ohne Ethylen") keine Wirkung. Die täglichen Ethylenbehandlungen ab Tag 9 hatten jedoch einen deutlichen Effekt auf die Respiration und führten bei den beiden 1-MCP-Varianten "mit Ethylen, mit MCP" sowie "mit MCP, mit Ethylen" zu einem Anstieg der CO₂-Produktion. Insgesamt bewirkte die 1-MCP Anwendung zu Termin 1 eine deutlich stärkere Inhibierung der Respiration als die Behandlung zu Termin 2.

In Bezug auf die Ethylenbildung (Abb. 37) führte die 1-MCP-Behandlung zu Termin 1 zu einer kompletten Hemmung. Wie bei der Atmung zeigten auch hier alle anderen Varianten einen Anstieg zu Beginn des Shelf-lifes. Auch die 1-MCP Behandlung zu Termin 2 führte zu einer starken Hemmung der Ethylenproduktion, wogegen die Ethylenbildung aller anderen Varianten weiter anstieg. Dagegen konnte ein eindeutiger Effekt der Ethylen-Behandlungen auf die Steigerung der Ethylenbildungsrate der Früchte nicht nachgewiesen werden.

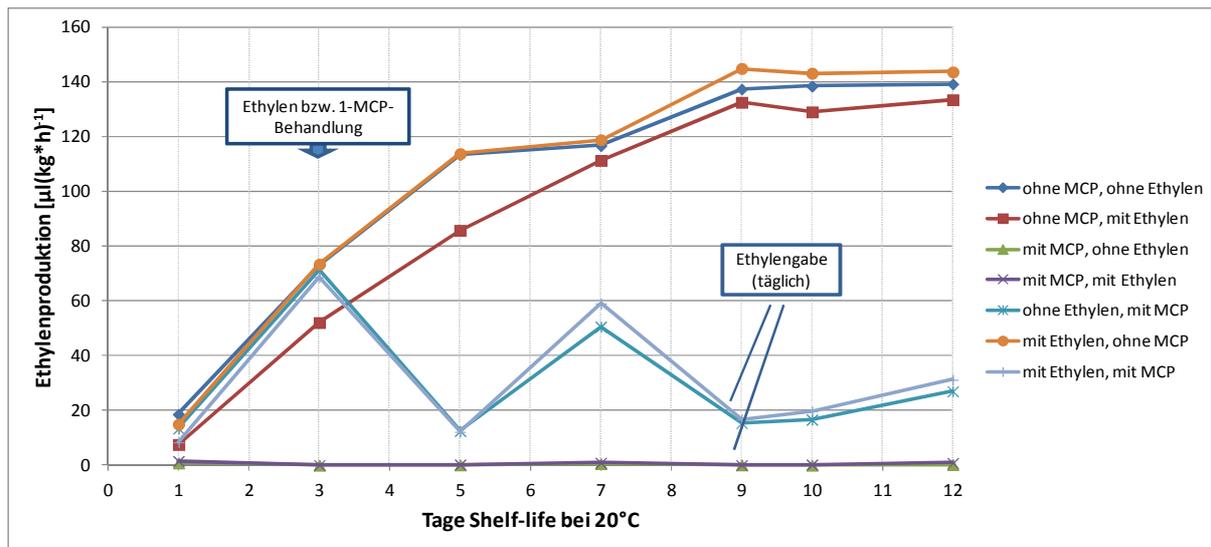


Abbildung 37: Einfluss von Ethylen- und 1-MCP auf die Ethylenproduktion bei 'Golden Delicious' während 12 Tagen Shelf-life bei 20°C (Versuch 9: 2010).

4.3 Einfluss von Sorte und Lagerfaktoren auf die Genexpression zellwandabbauender Enzyme

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genexpression (II) von β -Galactosidase (β -Gal), Expansin (Exp), Polygalacturonase (PG), Xyloglucan-Endotransglycosylase I+II (XTH I, II), Arabinofuranosidase (AFase) sowie Pectatlyase (PL) bzw. der im Rahmen der Ca-Infiltrationsversuche durchgeführten Analysen (I) für Polygalacturonase, Endoglucanase (EGase), Pectatlyase, β -Xylosidase (β -Xyl), β -Galactosidase sowie Pektinmethylesterase (PME) in Abhängigkeit der Sorte sowie verschiedener Lagerfaktoren dargestellt. Zur besseren optischen und statistischen Darstellung wurden die jeweiligen Expressionswerte z.T. mit entsprechenden Faktoren, wie in den Tabellen bzw. Abbildungen angegeben, multipliziert. Die Ergebnisse beinhalten dabei zum einen aus den Untersuchungen zum Einfluss der Lagermethode (Versuch 1: 2007/2008) jeweils Daten der drei Analysentermine "Ernte + Shelf-Life", "Kühlager + Shelf-Life" sowie "ULO-Lager + Shelf-Life". Zum anderen stammen die Ergebnisse von Untersuchungen an Früchten zum Einfluss von Ca-Infiltrationen (Versuch 2: 2007/2008) unmittelbar zur Ernte sowie ebenfalls im Anschluss an die Shelf-Life Phase nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung.

4.3.1 Einfluss der Sorte

Tabelle 27 zeigt die Genexpression verschiedener zellwandabbauender Enzyme bei den Sorten `Elstar` und `Pinova` nach 10 Tagen Shelf-Life bei 20°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte (Versuch 1: 2007/2008). Außer der Genexpression von Md-PL, welches für die Pectatlyase kodiert, war bei allen anderen Enzymen ein mindestens signifikanter Unterschied zwischen den beiden Sorten zu beobachten. Die Genexpression von Md-PG2 (Polygalacturonase) und Md-Exp2 (Expansin) war bei `Elstar` hochsignifikant größer, die Expressionslevel von Md-β-GS (β-Galactosidase) und Md-XTH10 (Xyloglucan-Endotransglycosylase 2) sowie Md-AFase (Arabinofuranosidase) signifikant höher als bei `Pinova`. Nur bezüglich Md-XTH2 (Xyloglucan-Endotransglycosylase 1) war bei `Pinova` eine höhere Genexpression messbar als bei `Elstar`.

Tabelle 27: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Mittelwertvergleich zur Genexpression von β-Galactosidase, Expansin, Polygalacturonase, Xyloglucan-Endotransglucosylase (I+II), Arabinofuranosidase sowie Pectatlyase bei `Elstar` und `Pinova` nach 10 Tagen Shelf-life (SL) bei 20°C unmittelbar im Anschluss an die Ernte (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Sorte	Variante	β-Galactosidase (Md β-GS) x 10 ⁴			Expansin (Md Exp2) x 10 ⁴			Polygalacturonase (Md PG2) x 10 ⁴			Xylogluc.-Endotrans. (Md XTH2) x 10 ⁴			Xylogluc.-Endotrans. (Md XTH10) x 10 ⁴			Arabinofuranosidase (Md AFase) x 10 ⁵			Pectatlyase (Md PL) x 10 ⁷		
		Niv.	Mittel	Sign.	Niv.	Mittel	Sign.	Niv.	Mittel	Sign.	Niv.	Mittel	Sign.	Niv.	Mittel	Sign.	Niv.	Mittel	Sign.	Niv.	Mittel	Sign.
Elstar	Ernte + 10 Tage SL		6,22	a		2,71	a		87,00	a		0,59	b		1,94	a		1,62	a		0,49	a
		*			**			**			**			*			*			n.s.		
Pinova	Ernte + 10 Tage SL		0,70	b		1,12	b		2,06	b		1,86	a		1,45	b		0,98	b		5,54	a

Da die Lagerdauer bis zur zweiten Auslagerung mit 9,5 Monaten für `Elstar` bzw. 8 Monaten für `Pinova` für beide Sorten unterschiedlich war, erfolgte nach Auslagerung kein statistischer Vergleich beider Sorten bezüglich der Genexpression zellwandabbauender Enzyme. Wie Tabelle 28 zeigt, waren tendenziell bezüglich Md β-GS (β-Galactosidase), MdExp2 (Expansin), MdPG2 (Polygalacturonase), MdXTH2 (Xyloglucan-Endotransglycosylase 1) und MdAFase (Arabinofuranosidase) bei `Elstar` nach 8 Tagen Shelf-life im Anschluss an die Kühl- bzw. ULO-Lagerung höhere Genexpressionen zu messen als bei `Pinova`.

4.3.2 Einfluss der Lagermethode

Die Lagermethode hatte bei `Elstar` in den Analysen im Anschluss an die Shelf-life Phasen nach der Ernte sowie nach 9 (`Elstar`) bzw. 8,5 (`Pinova`) Monaten Kühl- und ULO-Lagerung (Versuch 1) bei allen Enzymen, außer der AFase, einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression, wobei der Bonferroni-Test im Anschluss an die Varianzanalyse Unterschiede in den Expressionswerten der β -Galactosidase sowie der Pectatlyase nicht bestätigen konnte (Tab. 28). Bei der β -Galactosidase waren an der Variante "ULO + Shelf-life" die höchsten Expressionswerte zu messen. Bezogen auf Expansin zeigten sich die höchsten Werte nach dem Shelf-life im Anschluss an die Ernte, gefolgt von der Kühlager-Variante. Die ULO-Lagerung führte hier zu einer deutlich niedrigeren Genexpression. Im Gegensatz dazu konnten für die Polygalacturonase im Anschluss an die ULO-Lagerung + Shelf-life die höchsten Expressions-Level analysiert werden. Die Werte bei Ernte bzw. Kühlager + Shelf-life unterschieden sich nicht voneinander. Xyloclucan-Endotransglycosylase (I) zeigte deutlich höhere Expressionswerte nach der Lagerung, sowohl bei der Kühlager- als auch bei der ULO-Lager-Variante. Beide unterschieden sich nicht voneinander und wiesen signifikant höhere Expressionswerte auf als die Früchte im Anschluss an die "Ernte + Shelf-life". Die Expressionslevel der Xyloclucan-Endotransglycosylase (II) hingegen waren zur "Ernte + Shelf-life" deutlich höher als nach der Lagerung.

Tabelle 28: Ergebnisse der mehrfaktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss von Lagerung und Shelf-Life (SL) auf die Genexpression von β -Galactosidase, Expansin, Polygalacturonase, Xyloglucan-Endotransglucosylase (I+II), Arabinofuranosidase sowie Pectatlyase bei `Elstar` und `Pinova`. Mittelwerte beinhalten Ergebnisse 1-MCP behandelte sowie unbehandelte Früchte (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

		Lagermethode																				
Sorte	Variante	β -Galactosidase (Md β -GS) $\times 10^4$			Expansin (Md Exp2) $\times 10^4$			Polygalacturonase (Md PG2) $\times 10^4$			Xylogluc.-Endotrans. (Md XTH2) $\times 10^4$			Xylogluc.-Endotrans. (Md XTH10) $\times 10^4$			Arabinofuranosidase (Md AFase) $\times 10^5$			Pectatlyase (Md PL) $\times 10^7$		
		Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.
Elstar	Ernte + SL		3,66	a		1,45	a		43,68	b		0,65	b		1,62	a		1,15	a		0,27	a
	Kühlager + SL	*	2,66	a	**	1,22	b	**	43,03	b	**	1,72	a	**	1,09	b	n.s.	1,22	a	*	0,28	a
	ULO + SL		2,76	a		0,63	c		84,93	a		1,62	a		1,12	b		1,02	a		0,09	a
Pinova	Ernte + SL		0,49	b		0,70	ab		1,03	b		1,62	b		1,38	a		0,75	a		6,60	a
	Kühlager + SL	**	0,80	a	*	0,75	a	**	10,83	a	**	1,71	b	n.s.	1,44	a	n.s.	0,91	a	n.s.	7,49	a
	ULO + SL		0,47	b		0,60	b		18,37	a		3,74	a		1,27	a		0,76	a		4,92	a

Bei `Pinova` hatte die Lagermethode auf die Genexpression von β -Galactosidase, Expansin, Polygalacturonase sowie Xyloclucan-Endotransglycosylase (I) einen deutlichen Einfluss. Bezüglich der restlichen Enzyme war keine Wirkung zu sehen (Tab. 28). Bei β -Galactosidase zeigte die Variante "Kühllager + Shelf-Life" die höchsten Expressionswerte. "Ernte + Shelf-life" bzw. "ULO + Shelf-life" lagen deutlich niedriger und unterschieden sich nicht voneinander. Auch bei Expansin waren nach Kühllagerung die höchsten Expressionswerte zu messen, nach dem ULO-Lager die niedrigsten. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der Polygalacturonase sowie der Xyloclucan-Endotransglycosylase (I) nach ULO-Lagerung + Shelf-life die höchsten und zur Ernte + Shelf-life die niedrigsten Expressionslevel.

Bei einem Teil der Enzyme bestanden Wechselwirkungen zwischen Lagermethode bzw. Analysenzeitpunkt und 1-MCP auf die Expression der entsprechenden Gene. So waren bei `Elstar` bezüglich der Genexpression von β -Gal, PG und XTH (I) nur an den Kontrollfrüchten ohne 1-MCP, nicht jedoch an den 1-MCP behandelten Äpfeln Unterschiede zwischen "Ernte + Shelf-life", "Kühllager + Shelf-life" und "ULO-Lager + Shelf-life" festzustellen. Gleiches konnte an `Pinova` bezüglich der Genexpression der PG beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Expressionswerte der PL nur an den 1-MCP behandelten Äpfeln signifikant unterschiedlich, nicht jedoch an Kontrollfrüchten ohne 1-MCP. Weitere Informationen zur Wirkung von 1-MCP auf die Genexpression der untersuchten Enzyme werden im folgenden Kapitel gegeben.

Eine Beschreibung der Ergebnisse zum Einfluss der Lagermethode in den Untersuchungen mit Calciuminfiltrationen erfolgt in Kapitel 4.3.4.

4.3.3 Einfluss von 1-MCP

Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse der statistischen Auswertung zum Einfluss von 1-MCP auf die Genexpression von β -Galactosidase, Expansin, Polygalacturonase, Xyloglucan-Endotransglycosylase (I+II), Arabinofuranosidase sowie Pectatlyase bei `Elstar` und `Pinova`. 1-MCP hemmte bei `Elstar` deutlich die Genexpression aller untersuchten Enzyme. Vor allem bezüglich der Polygalacturonase waren erhebliche Unterschiede zwischen 1-MCP und Kontrollvariante zu beobachten. Bei `Pinova` konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der 1-MCP Behandlung auf die Genexpression der Xyloglucan-Endotransglycosylase (II) sowie der

Arabinofuranosidase festgestellt werden. Die Genexpression der Pectatlyase war bei `Pinova` in den 1-MCP behandelten Äpfeln deutlich höher als in der Kontrolle. Bei allen anderen Enzymen konnten signifikant niedrigere Expressionslevel in den 1-MCP behandelten Früchten gemessen werden. Vor allem bezüglich β -Galactosidase, Expansin und Polygalacturonase zeigte die Kontrollvariante bei `Elstar` deutlich höhere Expressionswerte als bei `Pinova`. Dementsprechend war auch die hemmende Wirkung von 1-MCP auf die Genexpression dieser Enzyme bei `Elstar` stärker ausgeprägt als bei `Pinova`.

Tabelle 29: Ergebnisse der mehrfaktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss von 1-MCP auf die Genexpression von β -Galactosidase, Expansin, Polygalacturonase, Xyloglucan-Endotransglucosylase (I+II), Arabinofuranosidase sowie Pectatlyase bei `Elstar` und `Pinova`. Mittelwerte beinhalten Ergebnisse der drei Analysentermine "Ernte + 10 Tage Shelf-life" sowie "9,5 (Elstar) bzw. 8 (Pinova) Monate Kühl- bzw. ULO-Lagerung + 7 Tage Shelf-life" (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

		1-MCP																							
Sorte	Var.	β -Galactosidase (Md β -GS) $\times 10^4$			Expansin (Md Exp2) $\times 10^4$			Polygalacturonase (Md PG2) $\times 10^4$			Xylogluc.-Endotrans. (Md XTH2) $\times 10^4$			Xylogluc.-Endotrans. (Md XTH10) $\times 10^4$			Arabinofuranosidase (Md AFase) $\times 10^5$			Pectatlyase (Md PL) $\times 10^7$					
		Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.	Einfl.	Mittel	Sign.			
		Elstar	ohne	**	4,89	a	**	1,67	a	**	106,32	a	**	1,66	a	**	1,46	a	**	1,46	a	**	0,34	a	
mit			1,16	b		0,53	b		8,10	b		1,00	b		1,09	b		0,79	b		0,09	b			
Pinova	ohne	**	1,00	a	**	0,97	a	**	20,55	a	**	3,13	a	n.s.	1,30	a	n.s.	1,00	a	**	3,68	b			
	mit		0,18	b		0,39	b		-0,40	b		1,58	b		1,43	a		0,60	a		8,99	a			

Zur besseren Erfassung der Ergebnisse zeigt Abbildung 38 A-G grafische Darstellungen der durchschnittlichen Expressionswerte der einzelnen Enzyme, jeweils "zur Ernte + Shelf-life", sowie nach 9 (`Elstar`) bzw. 8,5 (`Pinova`) Monaten "Kühlager + Shelf-life" und "ULO-Lager + Shelf-life" in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP. Die Fehlerindikatoren geben dabei die Standardabweichung an. Tab. 30 zeigt dazu die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Mittelwertvergleich.

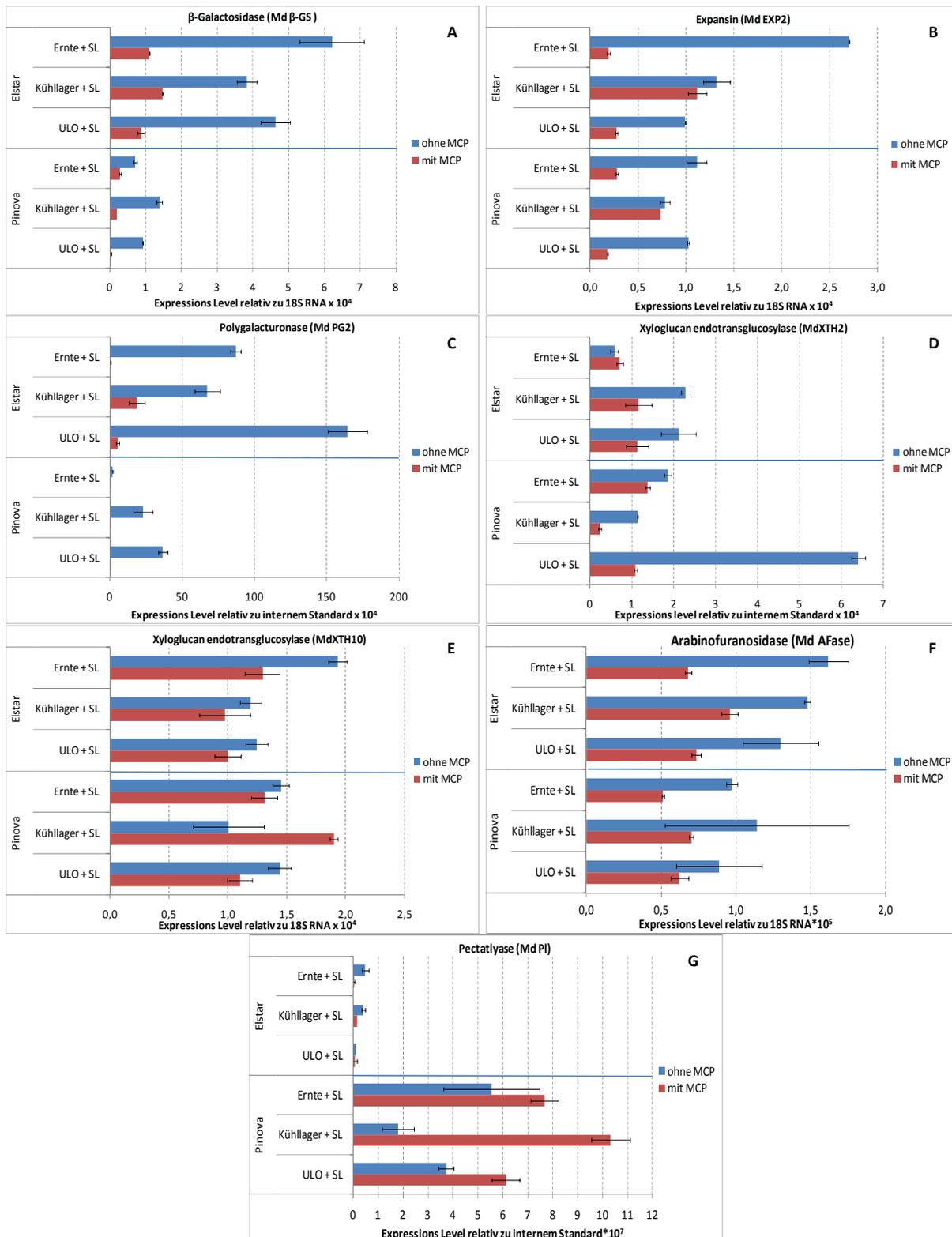


Abbildung 38: Genexpression von β -Galactosidase (A), Expansin (B), Polygalacturonase (C), Xyloglucan-Endotransglycosylase I, II (D,E), Arabinofuranosidase (F), Pectatylase (G) bei 'Elstar' u. 'Pinova' nach 10 Tagen Nachlagerung bei 20°C im Anschluss an die Ernte sowie nach 9,5 ('Elstar') bzw. 8 ('Pinova') Monaten Kühl- oder ULO-Lagerung und 7-tägiger Nachlagerung bei 20°C. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. (Versuch 1: 2007/2008).

Tabelle 30: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Mittelwertvergleich zur Genexpression von β -Galactosidase, Expansin, Polygalacturonase, Xyloglucan-Endotransglycosylase (I+II), Arabinofuranosidase sowie Pectatlyase an `Elstar` und `Pinova` "zur Ernte + Shelf-life", sowie nach 9,5 (`Elstar`) bzw. 8 (`Pinova`) Monaten "Kühllager + Shelf-life" und "ULO-Lager + Shelf-life" in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Sorte	Termin	ohne/mit MCP	β -Gal. /10 ⁴		Expansin /10 ⁴		PG /10 ⁴		XTH2 /10 ⁴		XTH10 /10 ⁴		Afase /10 ⁵		PL / 10 ⁷	
			Mittel	Sign.	Mittel	Sign.	Mittel	Sign.	Mittel	Sign.	Mittel	Sign.	Mittel	Sign.	Mittel	Sign.
Elstar	zur Ernte + SL	ohne MCP	6,22	a	2,71	a	87,00	b	0,59	b	1,94	a	1,62	a	0,49	a
		mit MCP	1,11	c	0,20	c	0,35	c	0,71	b	1,30	b	0,68	d	0,03	b
	Kühllager + SL	ohne MCP	3,84	b	1,32	b	67,45	b	2,28	a	1,20	b	1,48	ab	0,41	ab
		mit MCP	1,48	c	1,12	b	18,60	c	1,15	ab	0,98	b	0,96	bcd	0,16	ab
	ULO + SL	ohne MCP	4,63	ab	0,99	b	164,50	a	2,12	a	1,25	b	1,30	abc	0,11	ab
		mit MCP	0,88	c	0,27	c	5,36	c	1,13	ab	1,00	b	0,74	cd	0,07	b
Pinova	zur Ernte + SL	ohne MCP	0,70	B	1,12	A	2,06	B	1,86	B	1,45	AB	0,97	A	5,54	BC
		mit MCP	0,29	C	0,28	DE	0,01	B	1,38	C	1,31	AB	0,51	A	7,67	B
	Kühllager + SL	ohne MCP	1,39	A	0,78	BC	22,90	A	1,14	C	1,01	B	1,14	A	1,79	C
		mit MCP	0,20	C	0,74	CD	0,23	B	2,30	B	1,90	A	0,70	A	10,32	A
	ULO + SL	ohne MCP	0,92	B	1,03	AB	36,70	A	6,40	A	1,44	AB	0,89	A	3,72	BC
		mit MCP	0,03	D	0,18	E	0,03	B	1,09	C	1,11	AB	0,62	A	6,12	BC

Abbildung 39 zeigt den Einfluss von 1-MCP auf die Genexpression für Polygalacturonase, Endoglucanase, Pectatlyase, β -Xylosidase, β -Galactosidase sowie Pektinmethylesterase aus dem Ca-Infiltrationsversuch. Die Mittelwerte in der Darstellung stammen nur von Kontrollfrüchten ohne Ca-Infiltration. Nach Abb. 39 führte 1-MCP bei PG, EGase, PL sowie β -Xyl zu einer deutlichen Inhibierung der Genexpression. Bei PME und β -Gal waren die Ergebnisse weniger eindeutig. Die Expressionswerte der β -Galactosidase waren nur nach Kühllagerung durch 1-MCP gehemmt, die der Pektinmethylesterase hingegen nur nach CA-Lagerung.

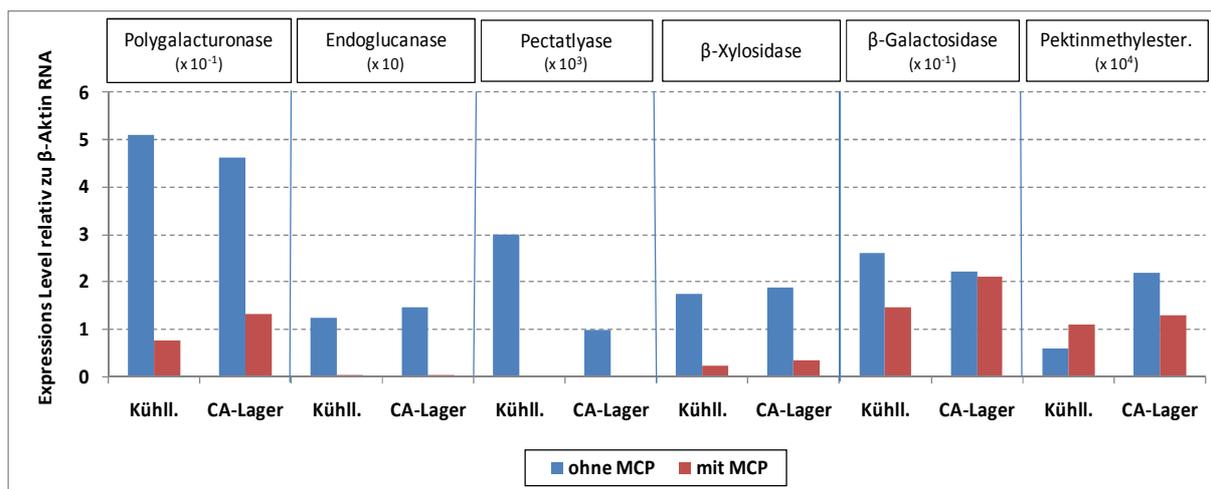


Abbildung 39: Relative Werte der Genexpression von Polygalacturonase, Endoglucanase, Pectatlyase, β -Xylosidase, β -Galactosidase sowie Pektinmethylesterase 1-MCP behandelter bzw. un behandelter `Elstar` Äpfel nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung und anschließender Shelf-Life Phase während 7 Tagen bei 20°C.

4.3.4 Einfluss von Calcium

Wie Abbildung 40 zeigt hatte die Infiltration mit Ca im Kühllager einen deutlich hemmenden Effekt auf die Genexpression von PG, EGase, PL, β -Xyl sowie β -Gal. Die Expressionswerte der PME hingegen blieben von der Ca-Infiltration unbeeinflusst. Nach CA-Lagerung waren in den Ca-infiltrierten Äpfeln zum Teil höhere Expressionswerte zu messen als in den Kontrollfrüchten (PG, EGase, PL) bzw. es waren keine Unterschiede festzustellen (β -Gal, PME).

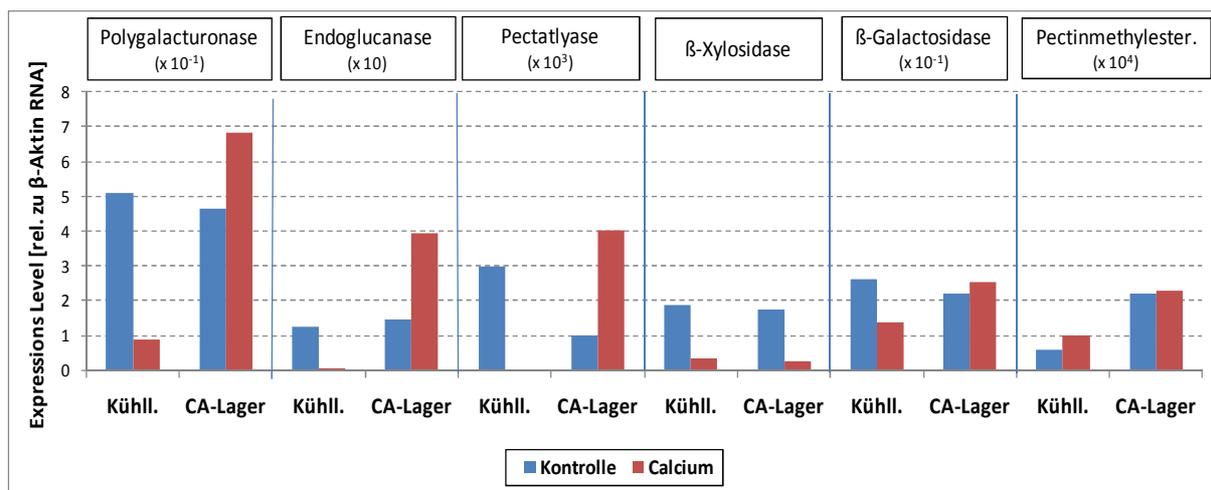


Abbildung 40: Relative Werte der Genexpression von Polygalacturonase, Endoglucanase, Pectatlyase, β -Xylosidase, β -Galactosidase sowie Pektinmethylesterase CaCl₂-infiltrierter Früchte bzw. von Kontrollfrüchten (ohne CaCl₂) der Sorte 'Elstar' nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung und anschließender Shelf-Life Phase während 7 Tagen bei 20°C.

Abbildung 41 A-F zeigt die relativen Werte der untersuchten Genexpressionen von Früchten mit und ohne Ca-Infiltration, in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP Behandlung nach 4,5 Monaten Kühl- sowie CA-Lagerung. Im Kühllager führte die CaCl₂-Infiltration an Äpfeln ohne 1-MCP bei fast allen Enzymen (PG, EGase, PL, β -Xyl, β -Gal) zu einer deutlichen Hemmung der Genexpression. Bei den 1-MCP behandelten Früchten war der inhibierende Effekt von 1-MCP auf die Genexpression vor allem bei PG, EGase, PL sowie β -Xyl bereits so ausgeprägt, dass Ca keine zusätzliche Wirkung mehr zeigte. Bei β -Gal sowie tendenziell bei PME war auch hier ein inhibierender Effekt der Ca-Behandlung zu beobachten, wobei 1-MCP alleine keine hemmende Wirkung zeigte.

Im CA-Lager war an den Äpfeln ohne 1-MCP im Gegensatz zum Kühllager nur bei β -Xyl ein inhibierender Effekt der Ca-Infiltration festzustellen. Bei PG, EGase, sowie PL führte Ca sogar zu höheren Werten der Genexpression im Vergleich zu den Früchten ohne Behandlung. Bei

β -Gal und PME waren keine Unterschiede zu sehen. Die 1-MCP Behandlung führte im CA-Lager bei den meisten Enzymen (PG, EGase, PL, β -Xyl) zu einer fast vollständigen Inhibierung der Genexpression. Eine hemmende Wirkung der CA-Lagerung auf die Genexpression konnte insgesamt in diesem Versuch nicht bestätigt werden.

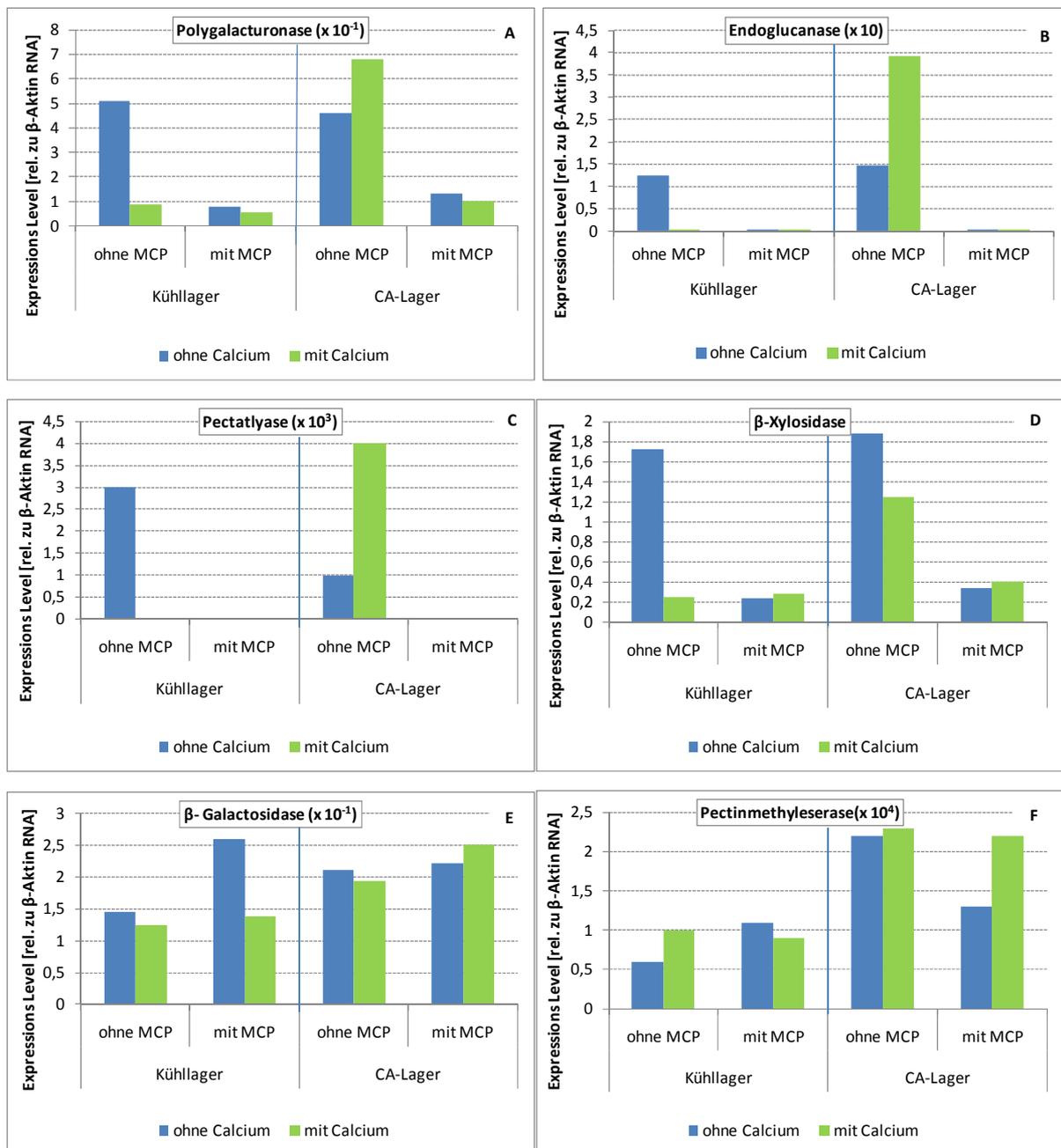


Abbildung 41: Genexpression von Polygalacturonase (A), Endoglucanase (B), Pectatlyase (C), β -Xylosidase (D), β -Galactosidase u. Pektinmethylesterase (F) von mit/ohne Ca-infiltrierten Früchten der Sorte 'Elstar' in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung und anschließender Shelf-Life Phase während 7 Tagen bei 20°C.

4.4 Einfluss von Sorte und Lagerfaktoren auf die Aktivität zellwandabbauender Enzyme

4.4.1 Einfluss der Sorte

Während 10 Wochen Lagerung bei normaler Atmosphäre und 10°C (Versuch 4: 2008/2009) zeigte sich ein hoch signifikanter Einfluss der Sorte auf die Enzymaktivität sowohl bei der β -Galactosidase wie auch der Pektinmethylesterase (Tab. 32). Dabei waren bei der festfleischigeren Sorte `Pinova` durchschnittlich niedrigere Aktivitäten der β -Galactosidase, jedoch höhere Aktivitäten der Pektinmethylesterase zu beobachten. Nähere Informationen zu Unterschieden zwischen den beiden Sorten bezüglich der Aktivität von β -Gal und PME werden in den Kapiteln 4.4.2 bis 4.4.4 gegeben.

4.4.2 Einfluss der Lagermethode

Tabelle 31 zeigt die Ergebnisse der zwei-faktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss von Lagermethode und 1-MCP auf die Aktivität von β -Galactosidase und Pektinmethylesterase bei den beiden untersuchten Sorten `Elstar` und `Pinova` (Versuch 1: 2007/2008).

Tabelle 31: Ergebnisse einer zweifaktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss von Lagermethode sowie 1-MCP auf die Enzymaktivität der β -Galactosidase sowie der Pektinmethylesterase nach 9 (`Elstar`) bzw. 8,5 (`Pinova`) Monaten Lagerung und anschließender Shelf-life-Phase während 7 Tagen bei 20°C (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	Elstar: β -Galactosidase [$\mu\text{mol pnp} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]			Elstar: Pektinmethylester. [$\Delta \text{ Abs.} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]			Pinova: β -Galactosidase [$\mu\text{mol pnp} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]			Pinova: Pektinmethylester. [$\Delta \text{ Abs.} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Lagermethode	Kühlager	**	0,978	a	**	-0,233	a	**	0,697	a	**	-0,338	a
	ULO-Lager		0,627	b		-0,205	b		0,463	b		-0,248	b
1-MCP	ohne 1-MCP	**	1,032	a	**	-0,265	a	**	0,697	a	*	-0,310	a
	mit 1-MCP		0,573	b		-0,173	b		0,463	b		-0,277	a
Lagermethode x 1-MCP	Kühlager, ohne 1-MCP		1,307	a		-0,293	a		0,893	a		-0,393	a
	Kühlager, mit 1-MCP	**	0,650	bc	**	-0,173	c	**	0,500	b	**	-0,283	b
	ULO-Lager, ohne 1-MCP		0,757	b		-0,237	b		0,500	b		-0,227	b
	ULO-Lager, mit 1-MCP		0,497	c		-0,173	c		0,427	b		-0,270	b

Das Messen der Enzymaktivität erfolgte dabei nach 7 tägiger Shelf-Life Phase bei 20°C im Anschluss an 9 Monate (Elstar) bzw. 8,5 Monate (Pinova) Kühl- bzw. ULO-Lagerung. Die jeweilige Lagermethode hatte bei beiden Sorten einen hochsignifikanten Einfluss auf die Aktivität sowohl der β -Gal als auch der PME. Dabei zeigten die Äpfel nach Kühlung stets höhere Enzymaktivitäten als nach ULO-Lagerung. Zwischen Lagermethode und 1-MCP Behandlung bestanden durchweg deutliche Wechselwirkungen. Bei den Früchten ohne 1-MCP führte die ULO-Lagerung stets zu einer deutlich inhibierten Enzymaktivität von β -Gal und PME im Vergleich zum Kühlungslager. Dies war bei beiden Sorten zu beobachten. An den mit 1-MCP behandelten Äpfeln hingegen unterschieden sich die beiden Lagermethoden bezüglich ihrer Wirkung auf die Enzymaktivität nicht voneinander. Informationen zur Wirkung von 1-MCP folgen in Kapitel 4.4.3.

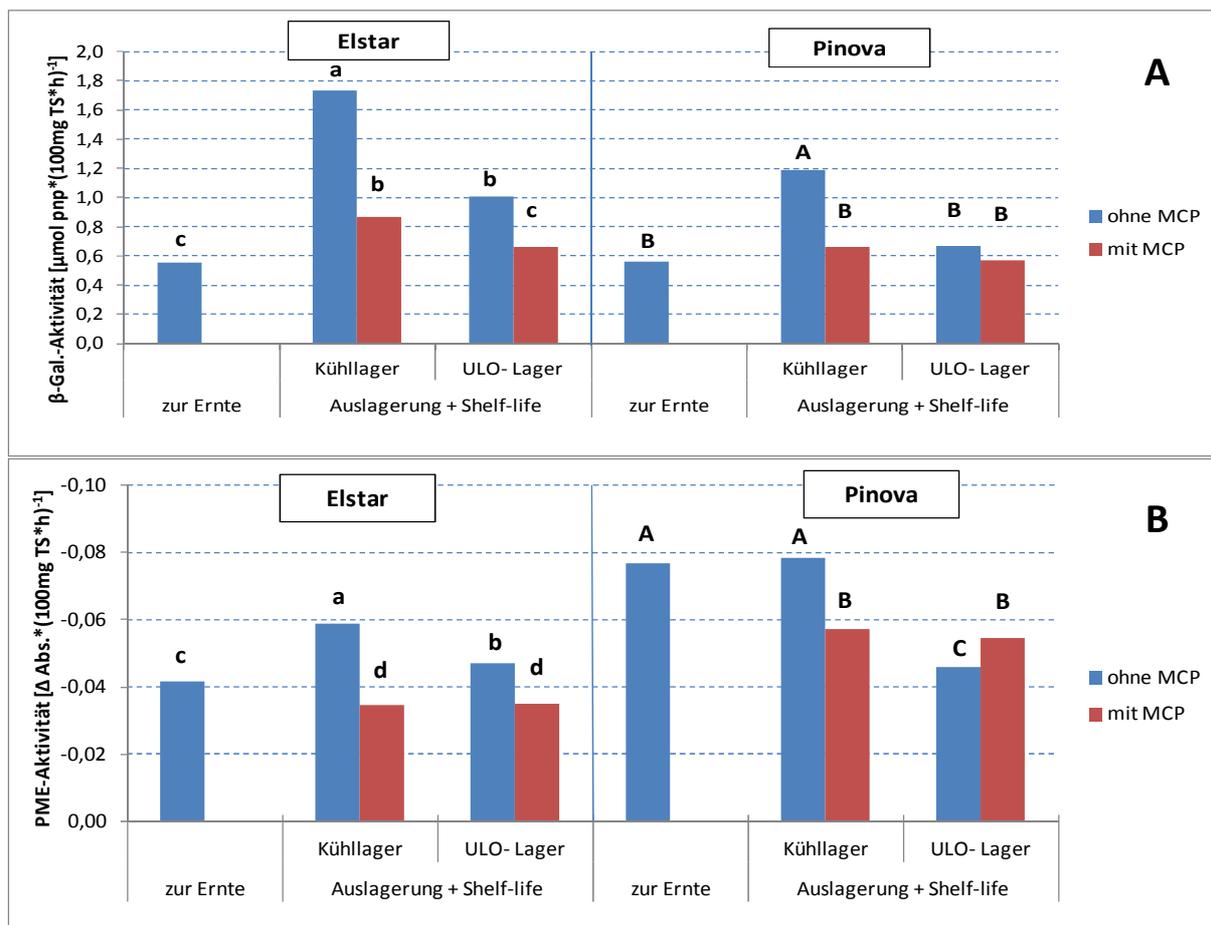


Abbildung 42: Enzymaktivität der β -Galactosidase (A) und der Pektinmethylesterase (B) bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Äpfeln der Sorten 'Elstar' und 'Pinova' zur Ernte sowie nach 9 ('Elstar') bzw. 8,5 ('Pinova') Monaten Lagerung und anschließender Shelf-life Phase während 7 Tagen bei 20°C (Versuch 1: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Die Abbildung 42 zeigt die Aktivität der beiden Enzyme im Anschluss an die Lagerung + Shelf-life im Vergleich zu unmittelbar nach Ernte. Bei `Elstar` war vor allem bei den Früchten ohne 1-MCP sowohl bezüglich der β -Galactosidase wie auch der Pektinmethylesterase ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivität während der Lagerung zu beobachten, wobei dieser im Kühllager deutlich stärker ausgeprägt war als bei ULO-Bedingungen.

Nach ULO-Lagerung war die gemessene Enzymaktivität jeweils signifikant niedriger als nach dem Kühllager, jedoch signifikant höher als zur Ernte. Bei `Pinova` zeigte die β -Galactosidase in den Kontrollfrüchten (ohne 1-MCP) nach Kühllagerung ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Aktivität, wogegen sich die Aktivität unter ULO-Bedingungen nicht von der zur Ernte unterschied. Die Aktivität der PME nahm bei `Pinova` in der ULO-Variante während der Lagerung ab. Zwischen der Enzymaktivität zur Ernte und nach Kühllagerung + Shelf-life waren hier keine Unterschiede festzustellen. Eine Beschreibung der Wirkung von 1-MCP folgt in Kapitel 4.4.3.

Eine 4-faktorielle Auswertung der Ergebnisse zur Wirkung von Ca-Infiltrationen ergab insgesamt bezüglich β -Gal- sowie PME-Aktivität keinen signifikanten Einfluss der Lagermethode (siehe Tabelle 33). Jedoch ließen sich gewisse Wechselwirkungen zwischen Lagermethode, Analysetermin (Auslagerung, Shelf-life), Ca-Infiltration sowie 1-MCP auf die Aktivität der β -Galactosidase und der PME feststellen (weiteres dazu siehe Kapitel 4.4.4).

4.4.3 Einfluss von 1-MCP

Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse einer dreifaktoriellen Auswertung zum Einfluss von Sorte, 1-MCP sowie Lagerdauer auf die Aktivität von β -Gal und PME bei `Elstar` und `Pinova` während 10 Wochen Lagerung bei normaler Atmosphäre und 10°C. Alle drei untersuchten Faktoren hatten dabei einen hochsignifikanten Einfluss auf die Aktivität beider Enzyme.

Wie Abbildung 43 zeigt, war bei `Elstar` in der Variante ohne 1-MCP während der 10 wöchigen Lagerung ein signifikanter Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität festzustellen, während bei den 1-MCP behandelten Äpfeln der Anstieg der Enzymaktivität vergleichsweise deutlich geringer ausfiel. Im Vergleich zu `Elstar` zeigte β -Gal bei `Pinova` während der 10-wöchigen Untersuchungsperiode einen nur mäßigen Aktivitätsanstieg in der Kontrollvariante

sowie in den 1-MCP behandelten Früchten, der aber über die ganze Versuchszeit betrachtet dennoch signifikant von Lagerbeginn bis Lagerende zunahm (Tabelle 32).

Tabelle 32: Ergebnisse einer dreifaktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss von Sorte, 1-MCP sowie Lagerdauer auf die Enzymaktivität der β -Galactosidase sowie der Pektinmethylesterase bei `Elstar` und `Pinova` während 10 Wochen Lagerung bei normaler Atmosphäre und 10°C (Versuch 4: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	β -Galactosidase-Aktivität [$\mu\text{mol pnp} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]			Pektinmethylester.-Aktivität [$\Delta \text{ Abs.} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Sorte	Elstar	**	0,533	a	**	-0,023	b
	Pinova		0,388	b		-0,034	a
1-MCP	ohne 1-MCP	**	0,542	a	**	-0,037	a
	mit 1-MCP		0,379	b		-0,020	b
Lagerdauer	5 Wochen	**	0,406	b	**	-0,033	a
	10 Wochen		0,515	a		-0,024	b

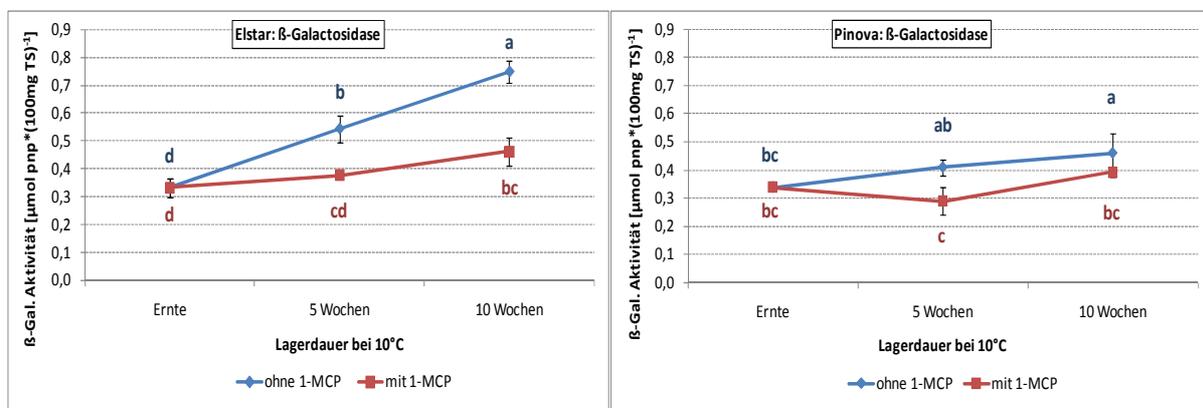


Abbildung 43: Änderung der β -Galactosidase-Aktivität bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Früchten der Sorten `Elstar` und `Pinova` während 10 Wochen Lagerung bei normaler Atmosphäre und 10°C (Versuch 4: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

Bezüglich der Aktivität der Pektinmethylesterase war bei `Elstar` zwischen Ernte und 5 Wochen Lagerung ein signifikanter Anstieg zu sehen, zwischen 5 Wochen und 10 Wochen blieb das Aktivitätsniveau jedoch in etwa gleich. Die 1-MCP Behandlung zeigte hier einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Enzymaktivität, so dass zwischen den drei Analysenterminen keine Unterschiede gemessen werden konnten. Bei `Pinova` stieg die

PME-Aktivität während der ersten 5 Wochen deutlich an, fiel jedoch anschließend bis zu Woche 10 sogar unter das Anfangsniveau zurück. Bei der 1-MCP Variante war eine kontinuierliche Abnahme der Enzymaktivität von der Ernte bis nach 10 Wochen Lagerung festzustellen (Abbildung 44).

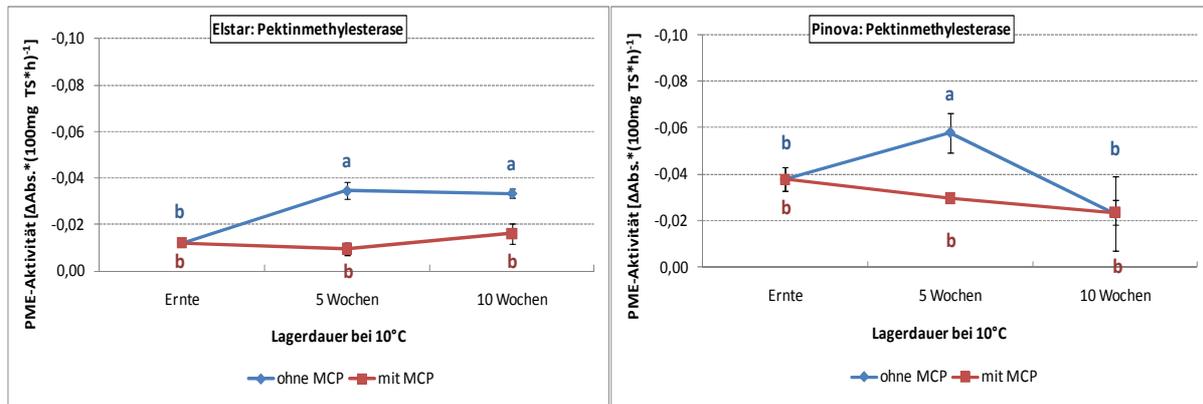


Abbildung 44: Änderung der Pektinmethylesterase-Aktivität bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Früchten der Sorten 'Elstar' und 'Pinova' während 10 Wochen Lagerung bei normaler Atmosphäre und 10°C (Versuch 4: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

In den Untersuchungen zum Einfluss der Lagermethode (Versuch 1: 2007/2008) zeigte sich ebenfalls ein deutlich inhibierender Effekt der 1-MCP Behandlung auf die Enzymaktivität von β -Gal und PME sowohl bei 'Elstar' wie auch bei 'Pinova' (Tab. 31). Wie die Abbildungen 42 A und B zeigen waren bei 'Elstar' nach dem Kühllager + Shelf-life stets deutlich niedrigere Enzymaktivitäten in den 1-MCP behandelten Äpfeln zu messen als in den Kontrollfrüchten ohne 1-MCP. Nach ULO-Lagerung war dies nur bei der Sorte 'Elstar' der Fall. Bei 'Pinova' waren keine Unterschiede (β -Gal) bzw. leicht höhere Aktivitäten (PME) bei der 1-MCP Variante zu verzeichnen. Die ULO-Lagerung bewirkte bei 'Pinova' eine deutliche Inhibierung der β -Galactosidase, so dass während der ULO-Lagerung + Shelf-life keine Veränderung der Enzymaktivität im Vergleich zur Ernte festzustellen war.

4.4.4 Einfluss von Calcium

Auch in den Untersuchungen zur Ca-Infiltration zeigte sich ein hochsignifikant inhibierender Effekt der 1-MCP Applikation auf β -Gal- sowie PME-Aktivität. Ca bewirkte sowohl bei der β -Galactosidase wie auch bei der Pektinmethylesterase eine Hemmung der Enzymaktivität.

Diese konnte statistisch mit hoher Signifikanz abgesichert werden, wie Tabelle 33 zeigt. Während dem Shelf-life war insgesamt eine Zunahme der Aktivität beider Enzyme zu beobachten.

Tabelle 33: Ergebnisse einer 4-faktoriellen Varianzanalyse zum Einfluss von Ca-Infiltration, Lagermethode, 1-MCP sowie Shelf-life auf die Enzymaktivität von β -Galactosidase und Pektinmethylesterase bei 'Elstar' nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung (Versuch 2: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Faktor	Variante	β -Galactosidase-Aktivität [$\mu\text{mol pnp} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]			Pektinmethylester.-Aktivität [$\Delta \text{ Abs.} \cdot (100\text{mg TS} \cdot \text{h})^{-1}$]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Calcium	ohne Ca^{2+}	**	0,715	a	**	-0,036	a
	mit Ca^{2+}		0,471	b		-0,028	b
Lager- methode	Kühllager	n.s.	0,607	a	n.s.	-0,033	a
	CA-Lager		0,578	a		-0,031	a
1-MCP	ohne	**	0,708	a	**	-0,037	a
	mit		0,477	b		-0,027	b
Shelf-Life	ohne	**	0,515	b	**	-0,030	b
	mit		0,671	a		-0,034	a

Die Wirkung der Ca-Infiltration war jedoch im Kühllager wesentlich stärker als im CA-Lager. Im Kühllager nahm die Aktivität der β -Galactosidase in den Früchten ohne Ca und ohne 1-MCP von der Ernte bis zur Auslagerung deutlich zu (Abb. 45 A), nach Ca-Infiltration kam es aber zu einer signifikanten Hemmung der Enzymaktivität. Die β -Gal-Aktivitäten der Calcium-infiltrierten Äpfel in Kombination mit sowie ohne 1-MCP unterschieden sich zur Auslagerung nicht von den zur Ernte gemessenen Werten, wogegen die Aktivität in den Früchten ohne Ca deutlich höher lag. Vor allem in den Äpfeln ohne 1-MCP waren die Unterschiede zwischen Ca-Variante und Kontrolle am größten und nahmen im Verlauf des Shelf-lifes noch weiter zu. Bei den 1-MCP behandelten Früchten hingegen unterschieden sich die beiden Varianten am Ende der Nachlagerung nicht mehr signifikant voneinander.

Im CA-Lager zeigte die Ca-Behandlung kaum Unterschiede in der Aktivität der β -Galactosidase zwischen den Varianten mit oder ohne 1-MCP (Abb. 45 B). Nur bei der Auslagerung waren bei den Äpfeln ohne 1-MCP geringere Enzymaktivitäten an den Calcium-infiltrierten Äpfeln im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Ansonsten war im CA-Lager vor allem ein inhibierender Effekt der 1-MCP Applikation zu beobachten (siehe Kapitel 3.4.2).

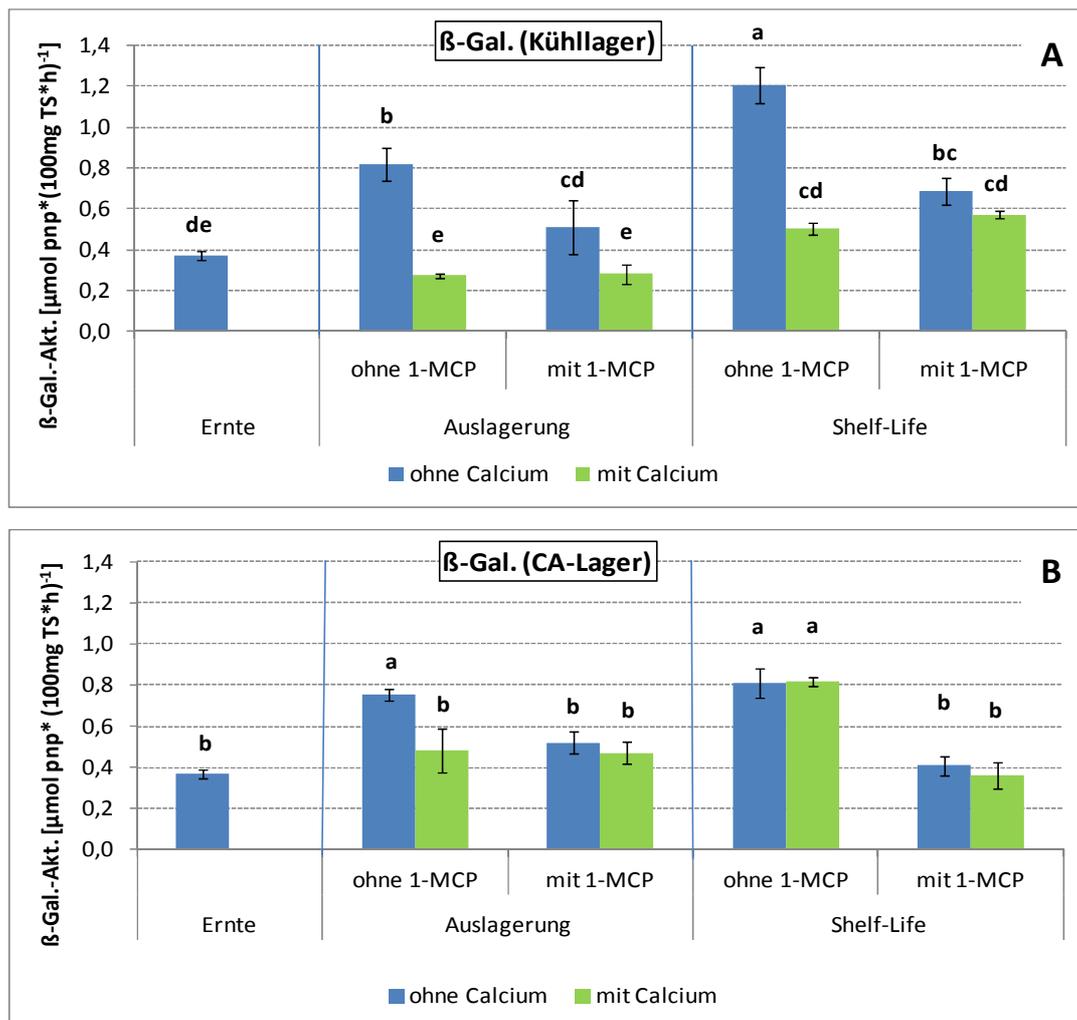


Abbildung 45: β -Galactosidase-Aktivität von CaCl_2 -infiltrierten Äpfeln sowie von Kontrollfrüchten (ohne Calciumbehandlung) der Sorte 'Elstar' in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP zur Ernte, nach 4,5 Monaten Kühl- (A) oder CA-Lagerung (B) sowie nach jeweils anschließender Shelf-Life Phase während 7 Tagen bei 20°C (Versuch 2: 2007/2008; $p \leq 0,05$).

Die PME-Aktivität zeigte im Kühllager von der Ernte bis zur Auslagerung ebenfalls einen deutlichen Anstieg. Während dem Shelf-life blieben die gemessenen Werte auf etwa gleichem Niveau. Unterschiede zwischen Ca-infiltrierten Äpfeln und Kontrollfrüchten waren

nur bei den Varianten ohne 1-MCP festzustellen. Bei den infiltrierten Früchten hatte die 1-MCP Behandlung keine zusätzliche hemmende Wirkung. Insgesamt waren im Kühllager nur bei Äpfeln ohne Ca-Infiltration und ohne 1-MCP im Verlauf der Lagerung sowie nach dem Shelf-life signifikant höhere Enzymaktivitäten feststellbar (Abb. 46 A).

Im CA-Lager konnte kein signifikanter Effekt der Ca-Behandlung auf die PME-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 46 B).

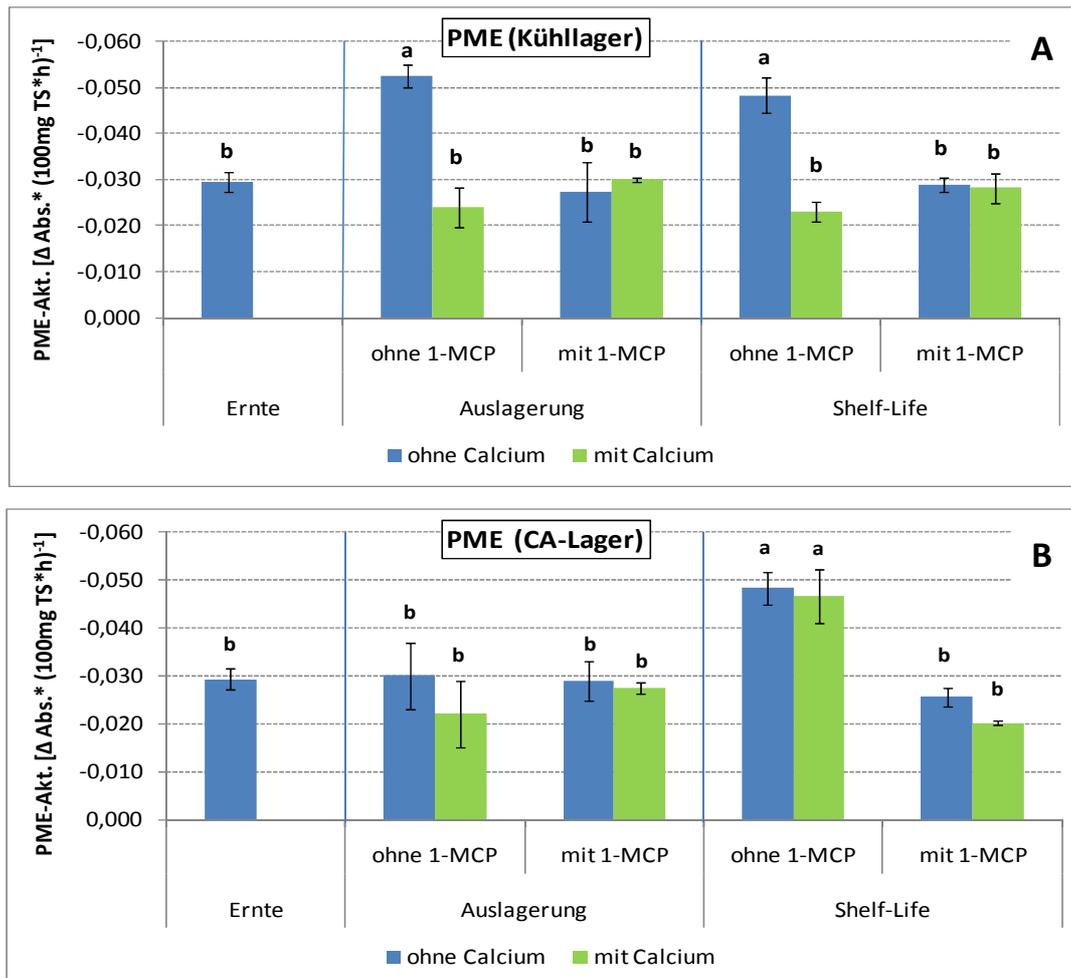


Abbildung 46: Pektinmethylesterase-Aktivität von Ca-infiltrierten Äpfeln sowie von Kontrollfrüchten (ohne Ca) der Sorte `Elstar` in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP, nach 4,5 Monaten Kühl- (A) oder CA-Lagerung (B) sowie nach jeweils anschließendem Shelf-life während 7 Tagen bei 20°C (Versuch 2: 2007/2008; $p < 0,05$).

4.5 Einfluss von Sorte und Lagerfaktoren auf die Pektinfraktionen der Zellwand

Im Folgenden wird der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Pektinfraktionen der Zellwand beschrieben. Die Ergebnisse stammen aus den Untersuchungen zur Ca-Infiltration (Versuch 2: 2007/2008) sowie aus dem Shelf-life Versuch mit 10-wöchiger Lagerung bei 10°C (Versuch 4: 2008/2009). Bei den Zellwandfraktionierungen erfolgten je Variante stets nur zwei Wiederholungen, was bei der Beurteilung der Ergebnisse der statistischen Auswertung zu berücksichtigen ist.

Wie in Kapitel 3.2.2 (Material und Methoden) beschrieben, erfolgte bei der Fraktionierung der Pektine eine Einteilung in bereits während der Fruchtreife gelöste (PAW-lösliche sowie H₂O-lösliche Fraktion), ionisch gebundene (CDTA-lösliche Fraktion) sowie kovalent gebundene (Na₂CO₃-lösliche Fraktion) Pektine.

4.5.1 Einfluss der Sorte

Eine mehrfaktorielle Auswertung der Ergebnisse des Shelf-life Versuches bei 10°C (Versuch 4: 2008/2009) ergab zwischen den beiden Sorten `Elstar` und `Pinova` hochsignifikante Unterschiede bezüglich der Menge an extrahierbarem Zellwandmaterial sowie an Phenol-Essigsäure-Wasser (PAW)-löslichen Pektinen, sowohl an den 1-MCP behandelten, wie auch an den Kontrollfrüchten (Tabelle 34). Bei `Pinova`, der Sorte mit der höheren Fruchtfleischfestigkeit, konnten deutlich größere Mengen an Zellwandmaterial extrahiert werden als bei `Elstar`. Entsprechend dazu war auch die Menge an PAW-löslichen (bereits während der Fruchtreife gelösten) Pektinen bei `Pinova` signifikant niedriger als bei `Elstar`. Dies konnte sowohl an den 1-MCP behandelten, wie auch an den Äpfeln ohne 1-MCP beobachtet werden. Bezüglich der Menge an CDTA-löslichen Pektinen konnten nur in den Kontrollfrüchten ohne 1-MCP signifikant höhere Werte bei `Pinova` gemessen werden, an den 1-MCP behandelten war dies nicht der Fall. Die Menge an H₂O-löslichen sowie an Na₂CO₃-löslichen Pektinen war nicht signifikant von der jeweiligen Sorte beeinflusst (Tabelle 34).

Tabelle 34: Zweifaktorielle Varianzanalyse zum Einfluss von Sorte und Lagerdauer auf den Gehalt an extrahierbarem Zellwandmaterial sowie an PAW-, H₂O-, CDTA und Na₂CO₃-löslichen Pektinen bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Früchten der Sorten `Elstar` und `Pinova` während 10 Wochen Lagerung bei 10°C (Versuch 4:2008/2009; p≤0,05).

Faktor	Variante	Zellwandmaterial (ZWM) [mg/ g TS]			PAW-lösliche Fraktion [mg/ g TS]			H ₂ O-lösliche Fraktion [mg/ 100mg ZWM]			CDTA-lösliche Fraktion [mg/ 100mg ZWM]			Na ₂ CO ₃ -lösliche Fraktion [mg/ 100mg ZWM]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
ohne 1-MCP																
Sorte	Elstar	**	143,2	b	**	6,1	a	n.s.	1,7	a	**	25,2	b	n.s.	13,9	a
	Pinova	**	180,0	a	**	3,2	b	n.s.	1,5	a	**	41,1	a	n.s.	14,4	a
Lagerdauer	Ernte		228,3	a		4,0	a		1,1	b		30,3	a		10,0	b
	5 Wochen	**	124,3	b	n.s.	4,9	a	*	2,1	a	n.s.	30,6	a	**	15,1	a
	10 Wochen		132,1	b		5,0	a		1,7	a		38,6	a		17,3	a
mit 1-MCP																
Sorte	Elstar	**	146,6	b	**	4,8	a	n.s.	1,0	a	n.s.	27,2	a	n.s.	13,1	a
	Pinova	**	184,9	a	**	2,8	b	n.s.	1,4	a	n.s.	32,3	a	n.s.	14,7	a
Lagerdauer	Ernte		228,3	a		4,0	a		1,1	a		30,3	a		10,0	b
	5 Wochen	**	139,7	b	n.s.	3,6	a	n.s.	1,0	a	n.s.	30,4	a	**	16,4	a
	10 Wochen		129,3	b		3,7	a		1,4	a		28,6	a		15,4	a

4.5.2 Einfluss der Lagermethode

Die Lagermethode zeigte in den Untersuchungen mit Ca-Infiltration weder signifikanten Einfluss auf die Menge an extrahiertem Zellwandmaterial, noch auf die PAW-lösliche Fraktion. Bezüglich der H₂O-löslichen, der CDTA-löslichen sowie der Na₂CO₃-löslichen Pektinfraktionen hingegen war jeweils ein hoch signifikanter Einfluss der Lagermethode zu erkennen. Die CA-Lagerung führte im Vergleich zum Kühllager zu einer deutlich geringeren Menge an H₂O-löslichen, also bereits gelösten, Pektinen in der Zellwand. Bei der PAW-löslichen Fraktion (ebenfalls gelöste Pektine) waren zwar andeutungsweise, jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennbar. Der Anteil an CDTA-löslichen (ionisch gebundenen) sowie Na₂CO₃-löslichen (kovalent gebundenen) Pektinen war bei den CA-Varianten im Durchschnitt signifikant höher als im Kühllager (Tab. 35).

Tabelle 35: Mehrfaktorielle Varianzanalyse zum Einfluss von Lagermethode, Calciuminfiltration, 1-MCP sowie Shelf-life auf den Gehalt an extrahierbarem Zellwandmaterial sowie an PAW-, H₂O-, CDTA und Na₂CO₃-löslichen Pektinen bei 'Elstar' nach 4,5 Monaten Lagerung bzw. anschließender Shelf-life Phase bei 20°C während 7 Tagen (Versuch 2: 2007/2008; p≤0,05).

Faktor	Variante	Zellwandmaterial (ZWM) [mg/ g TS]			PAW-lösliche Fraktion [mg/ g TS]			H ₂ O-lösliche Fraktion [mg/ 100 mg ZWM]			CDTA-lösliche Fraktion [mg/ 100 mg ZWM]			Na ₂ CO ₃ -lösliche Fraktion [mg/ 100 mg ZWM]		
		Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.	Einfluss	Mittel	Sign.
Lagermethode	Kühlager		125,1	a		3,9	a		3,1	a		17,1	b		13,1	b
	CA-Lager	n.s.			n.s.	3,7	a	**	0,9	b	**	37,6	a	**	16,8	a
Ca-Behandlung	ohne		126,6	a		3,9	a		2,7	a		29,7	a		14,5	a
	mit	n.s.			n.s.	3,7	a	**	1,2	b	**	25,0	b	n.s.	15,3	a
1-MCP	ohne		125,4	a	**	4,1	a	**	2,7	a	**	25,0	b	**	13,8	b
	mit	n.s.				3,5	b		1,3	b		29,7	a		16,1	a
Shelf-life	ohne	*	123,2	b	**	3,3	b	*	2,4	a	**	34,2	a	**	16,0	a
	mit		130,9	a		4,2	a		1,6	b		20,5	b		13,9	b

Von der Ernte bis zum Lagerende (nach 4,5 Monaten) nahm der Gehalt an extrahierbarem Zellwandmaterial insgesamt deutlich ab, gleichermaßen im Kühl- wie auch im CA-Lager. Während des Shelf-lifes war jedoch keine weitere Abnahme festzustellen (Abb. 48 A).

Dagegen erhöhte sich der Gehalt an PAW-löslichen Pektinen während des Shelf-lifes. Auch nach Kühlung war dies tendenziell zu beobachten, ließ sich jedoch nicht statistisch absichern. Auch war die Zunahme der gelösten Pektine (PAW) nur an den Früchten ohne 1-MCP feststellbar (Abb. 48 B).

Bei der H₂O-löslichen Fraktion konnten Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Lagermethode, Shelf-life, 1-MCP und Ca-Behandlung festgestellt werden. Im Durchschnitt waren hier nur zur Auslagerung nach 4,5 Monaten, jedoch nicht im Anschluss an das Shelf-life Unterschiede zwischen den Kühl- und CA-gelagerten Früchten zu erkennen. Wie Abb. 48 C zeigt, konnte dies auch nur an den Äpfeln ohne 1-MCP und ohne Ca-Infiltration beobachtet werden. Nach dem Shelf-Life war der Gehalt an H₂O-löslichem Pektin in der

entsprechenden Variante signifikant niedriger als nach Auslagerung und unterschied sich nicht mehr von den übrigen Varianten.

Die CDTA-lösliche Fraktion zeigte Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Lagermethode, Shelf-life, 1-MCP und Ca-Behandlung. Höhere Gehalte an CDTA-löslichen Pektinen in den CA-gelagerten Äpfeln konnten sowohl bei Lagerende als auch nach dem Shelf-Life beobachtet werden, wobei die Unterschiede bei Lagerende deutlich ausgeprägter waren (Abb. 48 D). Nach dem Shelf-life nahm der Gehalt an CDTA-löslichen Pektinen im Anschluss an beide Lagermethoden ab. Dies war sowohl an den Calcium-infiltrierten und an den Kontrollfrüchten ohne Ca sowie an den 1-MCP behandelten Äpfeln und den Äpfeln ohne 1-MCP-Behandlung festzustellen.

Zwischen Lagermethode und Ca-Infiltration zeigten sich Wechselwirkungen auf die Na_2CO_3 -löslichen Pektinfraktionen. In den Äpfeln ohne Ca waren die Unterschiede zwischen Kühl- und CA-Lager größer als an den Ca-infiltrierten Früchten. In beiden Fällen waren jedoch die Anteile der Na_2CO_3 -löslichen Fraktion nach dem CA-Lager größer als nach dem Kühllager (Abb. 48 E). Der Gehalt an Na_2CO_3 -löslichen Pektinen in der Zellwand war im Durchschnitt nach dem Shelf-Life geringer als zur Auslagerung, sowohl im Anschluss an die Kühl- wie auch an die CA-Lagerung.

4.5.3 Einfluss von 1-MCP

Entsprechend Tab. 35 konnte nach Ca-Infiltration (Versuch 2: 2007/2008) kein signifikanter Einfluss von 1-MCP auf die Gesamtmenge an extrahiertem Zellwandmaterial festgestellt werden, obwohl dessen Gehalt in den 1-MCP behandelten Äpfeln tendenziell höher lag als bei den Kontrollfrüchten. Jedoch war ein jeweils hochsignifikanter Einfluss von 1-MCP auf die PAW-, H_2O -, CDTA-, sowie Na_2CO_3 -löslichen Pektine festzustellen.

In den 1-MCP behandelten Äpfeln wurde ein signifikant niedrigerer Anteil an PAW-löslichen (gelösten) Pektinen gemessen als in den Kontrollfrüchten. Dabei bestanden Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Shelf-life und 1-MCP. Unterschiede zwischen mit und ohne 1-MCP konnten nur nach dem Shelf-life, nicht jedoch zur Auslagerung beobachtet werden. Wie Abb. 48 B zeigt, war dies außerdem nur im Kühllager der Fall.

Entsprechend Abb. 48 C war nur unmittelbar bei Kühlagerende (4,5 Monate) bei der Variante ohne Ca-Infiltration und ohne 1-MCP ein deutlich höherer Anteil an H₂O-löslichen Pektinen zu messen als bei der Ca-Variante ohne 1-MCP. Alle anderen Behandlungen unterschieden sich nicht voneinander. Der Anteil an CDTA-löslichen sowie Na₂CO₃-löslichen Pektinen in der Zellwand war bei den 1-MCP behandelten Früchten im Durchschnitt aller Lagerbehandlungen zwar signifikant höher als bei der Kontrolle ohne 1-MCP (Tab. 35), Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten waren zum Teil jedoch gering bzw. nicht vorhanden (Abb. 48 D+E).

Tabelle 36: Einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Mittelwertvergleich für den Gehalt an extrahierbarem Zellwandmaterial sowie an PAW-, H₂O-, CDTA und Na₂CO₃-löslichen Pektinen bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Früchten der Sorten `Elstar` und `Pinova` zur Ernte sowie nach 5 und 10 Wochen Lagerung bei 10°C (Versuch 4: 2008/2009; $p \leq 0,05$).

Sorte	Variante	Zellwandmaterial (ZWM)	Sign.	PAW	Sign.	H ₂ O	Sign.	CDTA	Sign.	Na ₂ CO ₃	Sign.
		[mg/ g TS]		[mg/ g TS]		[mg/ 100mg ZWM]		[mg/ 100mg ZWM]		[mg/ 100mg ZWM]	
Elstar	Ernte	205,45	ab	5,45	a	0,45	d	27,00	b	10,45	b
	5 Wochen ohne 1-MCP	116,80	c	6,35	a	2,25	ab	25,70	b	14,60	a
	5 Wochen mit 1-MCP	126,45	c	4,45	a	0,65	c	25,75	b	16,50	a
	10 Wochen ohne 1-MCP	107,20	c	6,40	a	2,45	a	22,90	b	16,60	a
	10 Wochen mit 1-MCP	107,95	c	4,40	a	1,85	abc	28,75	b	12,45	b
Pinova	Ernte	251,20	a	2,60	a	1,70	abcd	33,50	b	9,45	b
	5 Wochen ohne 1-MCP	131,85	c	3,35	a	1,90	abc	36,20	b	15,65	a
	5 Wochen mit 1-MCP	152,85	c	2,65	a	1,35	abcd	35,10	b	16,35	a
	10 Wochen ohne 1-MCP	157,00	bc	3,55	a	1,00	bcd	54,25	a	17,95	a
	10 Wochen mit 1-MCP	150,55	c	3,00	a	1,00	bcd	28,35	b	18,40	a

Im Shelf-life Versuch bei 10°C (Versuch 4: 2008/2009) ergab die mehrfaktorielle Auswertung einen signifikanten Einfluss von 1-MCP nur auf die PAW-lösliche Pektinfraktion, nicht jedoch auf die restlichen Fraktionen (keine graphische Darstellung der Ergebnisse). Dabei wiesen die 1-MCP behandelten Äpfel mit einem Mittelwert von 3,6 mg/100 mg Zellwandmaterial signifikant niedrigere Werte an gelösten Pektinen in der Zellwand auf als die Kontrollfrüchte mit 4,9 mg/100 mg. Zwar ergab die Varianzanalyse auch einen hochsignifikanten Einfluss auf die kovalent gebundenen, Na₂CO₃-löslichen Pektine, jedoch konnte der Bonferroni-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert der Kontrollfrüchte (16,2 mg/100 mg) und dem der 1-MCP-Varianten (15,9 mg/100 mg) bestätigen.

Tabelle 36 zeigt die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Mittelwertvergleich von Zellwandmaterial sowie allen untersuchten Pektinfraktionen bei `Elstar` und `Pinova` zur Ernte sowie nach 5 und 10 Wochen Lagerung bei 10°C. In Abbildung 47 A-E werden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Fehlerindikatoren geben dabei die Standardabweichung an.

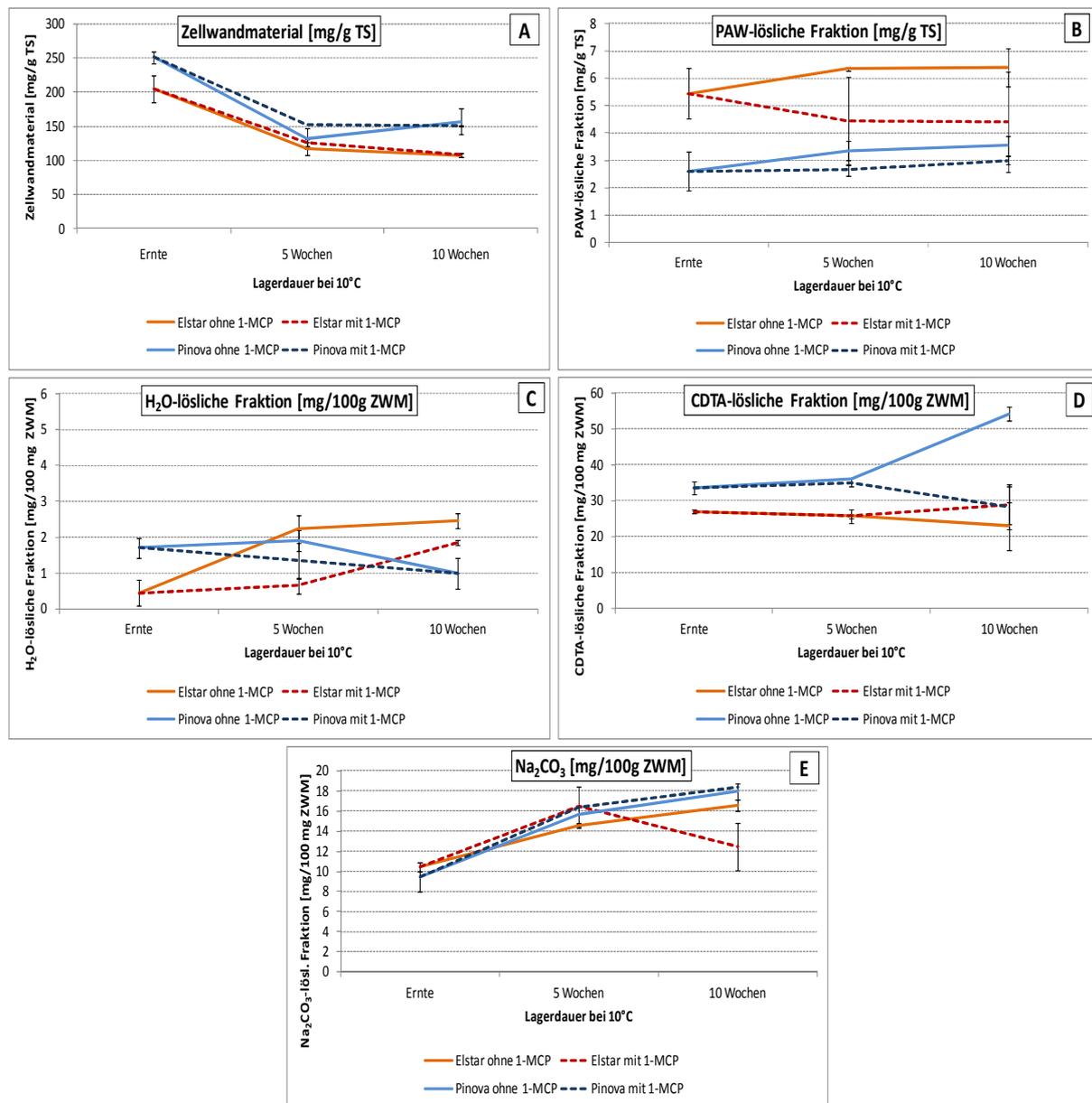


Abbildung 47: Gehalt an extrahierbarem Zellwandmaterial (A) sowie an PAW-(B), H₂O-(C), CDTA (D) und Na₂CO₃-(E) löslichen Pektinen bei 1-MCP behandelten sowie unbehandelten Früchten der Sorten `Elstar` und `Pinova` zur Ernte sowie nach 5 und 10 Wochen Lagerung bei 10°C (Versuch 4: 2008/2009; p≤0,05). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

4.5.4 Einfluss von Calcium

Die Infiltration mit Ca hatte einen hochsignifikanten Einfluss auf die H₂O-löslichen sowie CDTA-löslichen Pektine im Zellwandmaterial (Tab. 35).

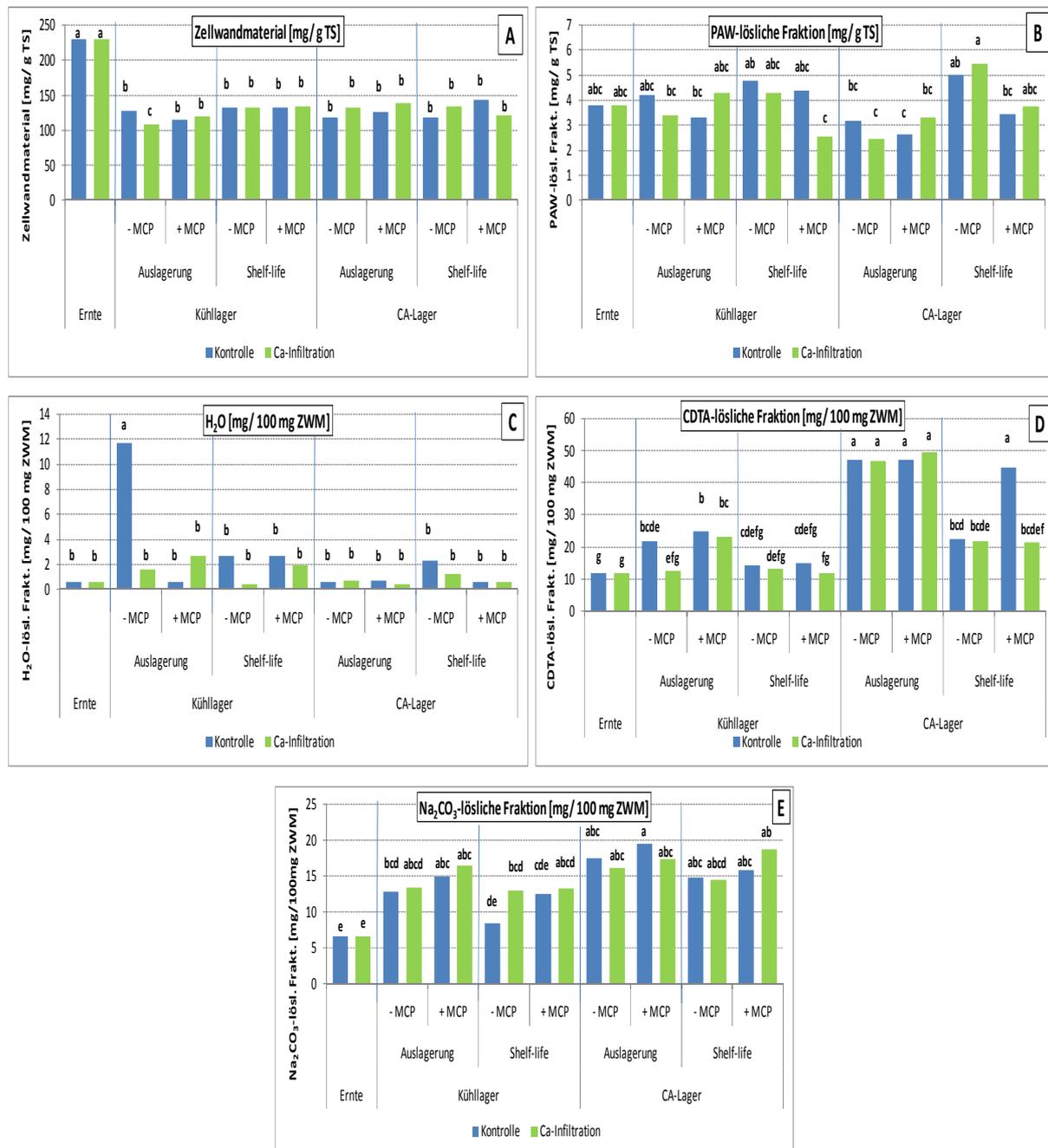


Abbildung 48: Gehalt an extrahierbarem Zellwandmaterial (A) sowie an PAW (B), H₂O (C), CDTA (D) und Na₂CO₃ (E) löslichen Pektinen bei Früchten der Sorte 'Eltar' mit und ohne Ca-Infiltration in Kombination mit bzw. ohne 1-MCP zur Ernte sowie nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung sowie nach anschließendem Shelf-Life während 7 Tagen bei 20°C (Versuch 2: 2007/2008; p≤0,05).

Dabei waren an den Ca-infiltrierten Früchten durchschnittlich niedrigere Gehalte an wasserlöslichen sowie an ionisch gebundenen (CDTA-löslichen) Pektinen zu messen als an den Äpfeln der Kontrolle ohne Ca-Infiltration. Bezüglich der Menge an extrahierbarem Zellwandmaterial sowie des Gehaltes an PAW- und Na_2CO_3 -löslichen Pektinen war keine Wirkung der Ca-Infiltration festzustellen. Die Mittelwerte der einzelnen Varianten sowie die Ergebnisse des einfaktoriellen Mittelwertvergleichs werden in den Abbildungen 48 A-D dargestellt. Bezüglich der H_2O -löslichen Pektine bestanden Wechselwirkungen zwischen Lagermethode, 1-MCP, Shelf-life und Ca-Infiltration. Die Ca-Infiltration zeigte nur zur Auslagerung im Kühllager, jedoch nicht im CA-Lager, sowie nur an Äpfeln ohne 1-MCP, nicht jedoch an den 1-MCP behandelten Früchten eine signifikante Wirkung auf den Gehalt an H_2O -löslichen Pektinen (Abb. 48 C). Signifikant höhere Gehalte an ionisch gebundenen Pektinen (CDTA) konnten nur nach dem Shelf-life im Anschluss an 4,5 Monate CA-Lagerung festgestellt werden (Abb. 48 D).

5 Diskussion

Die schematische Abbildung 49 beschreibt das Versuchsmodell der vorliegenden Arbeit. Um Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel in Zusammenhang mit dem Zellwandabbau während der Lagerung zu untersuchen, wurde die Wirkung der in der Abbildung rot markierten Einflussfaktoren in den verschiedenen Versuchen genauer geprüft. Die Pfeile symbolisieren einen zu erwartenden Einfluss des jeweiligen Faktors auf die einzelnen Parameter, bzw. mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren. Die im Zuge der Arbeit untersuchten Parameter sind in der Übersicht mit grünem Hintergrund markiert. Im Fokus der Versuche stand dabei die zentrale Rolle von Ethylen für die Steuerung der reifebezogenen Texturveränderungen während der Lagerung. Die beiden Apfelsorten `Elstar` und `Pinova` dienten jeweils als Modellsorten für Genotypen mit besonders stabilem Lagerverhalten bzw. geringem Festigkeitsverlust im Lager (`Pinova`) bzw. mit rascherem Weichwerden nach der Ernte (`Elstar`). Neben genetisch bedingten Sortenunterschieden und dem Einfluss des Erntetermins wurden vor allem die Wirkung verschiedener Lagerbedingungen, der Einsatz des Ethyleninhibitors 1-MCP sowie die Bedeutung von Calcium genauer untersucht. Insbesondere sollte dabei betrachtet werden, welchen Einfluss die einzelnen Parameter auf die am Zellwandabbau beteiligten Prozesse haben, auf welchen physiologischen Vorgängen diese Wirkung beruht und welche Folgen sich bezüglich der Fruchtfleischfestigkeit der Äpfel daraus ergeben. Um ein verbessertes Verständnis zu den Festigkeitsveränderungen beim Apfel zu bekommen, war es vor allem wichtig zu sehen, welche Rolle einzelne, am Zellwandabbau beteiligte Enzyme spielen und wie die untersuchten Parameter deren Genexpression und Aktivität beeinflussen. Die durchgeführten Zellwandfraktionierungen sollten dabei vor allem helfen, die Ergebnisse in Bezug zu Veränderungen der Pektinstrukturen in der Zellwand und somit letztlich zu Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit zu sehen.

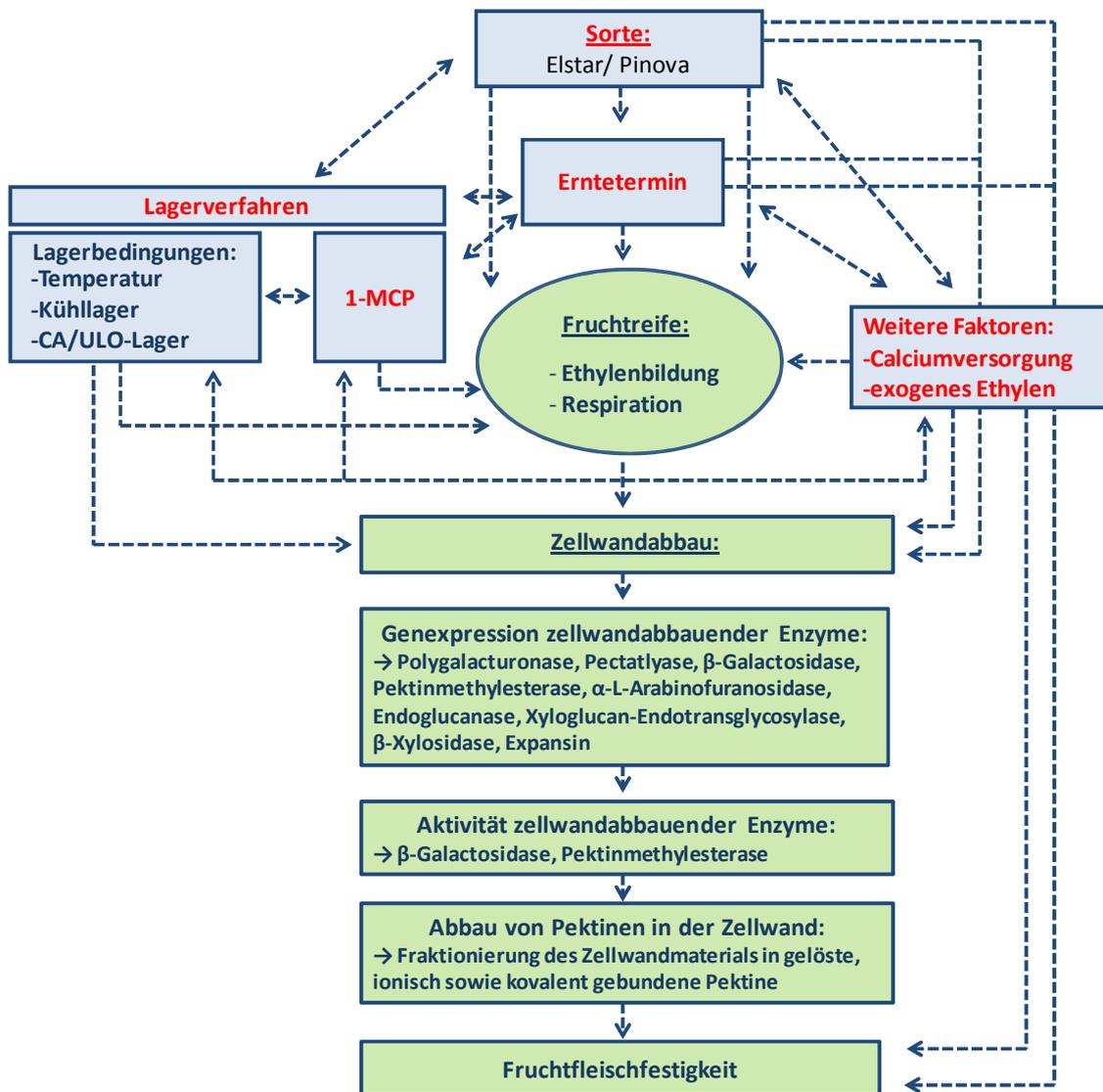


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Versuchsmodells mit den untersuchten Einflussfaktoren (rot) sowie den analysierten Parametern (grüner Hintergrund).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert, wobei eine Einteilung der Kapitel in die Themenschwerpunkte "Sortenunterschiede", "Lagermethoden", „Ethylen und 1-MCP“ sowie "Calcium" erfolgt. Innerhalb der einzelnen Kapitel werden die Resultate bezüglich Fruchtfleischfestigkeit, Fruchtreife, Genexpression und Aktivität zellwandabbauender Enzyme sowie des Pektinabbaus in der Zellwand behandelt und gegebenenfalls mit Erkenntnissen aus der Literatur verglichen. Im Anschluss daran werden in einer Zusammenfassung der Diskussion die wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit sowie deren praktische Bedeutung für die Obstwirtschaft herausgestellt und in Bezug zu den anfangs angeführten Versuchsfragen diskutiert.

5.1 Unterschiede zwischen den Sorten bezüglich Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau

Ein Hauptaugenmerk der durchgeführten Arbeit lag darauf, sortenbedingte Unterschiede bezüglich der Festigkeitseigenschaften im Lager bzw. die Ursachen für unterschiedlichen Abbau der Fruchtfleischfestigkeit genauer zu untersuchen.

Zwischen den beiden Apfelsorten `Elstar` und `Pinova` konnten in der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede bezüglich Fruchtfleischfestigkeit, Reifeverhalten, Genexpression sowie Aktivität zellwandabbauender Enzyme sowie des Abbaus von Pektinstrukturen beobachtet werden.

Während sich bei `Elstar` ein für viele Apfelsorten typischer, nicht linearer Abbau der Festigkeit in drei Phasen, wie von Johnston et al. (2002a) beschrieben, charakterisieren lies, waren bei `Pinova` die Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit während der Lagerung deutlich geringer und folgten einer linearen Abbaukurve. Die Wirkung von 1-MCP auf die Fruchtfleischfestigkeit war bei `Elstar` deutlich ausgeprägter als bei `Pinova`. Eine sortenabhängige Wirkungsintensität von 1-MCP konnte bereits von anderen Autoren bestätigt werden (z.B. Watkins et al., 2000; Bai et al. 2005). In den vorliegenden Untersuchungen wurde bei `Elstar` eine schnellere Abnahme der Festigkeit durch Zunahme der Lagertemperaturen deutlich gefördert, wogegen diese bei `Pinova`, zumindest bis zu einer bestimmten Lagerdauer, kaum Wirkung zeigten. Mit späterer Ernte nahm bei `Elstar`, `Pinova` sowie bei der Vergleichssorte `Golden Delicious` die Festigkeit ab, jedoch konnten auch diesbezüglich bei `Pinova` geringere Unterschiede festgestellt werden als bei den anderen beiden Sorten. Grundsätzlich zeigte sich, dass alle reifeinhibierenden bzw. Festigkeits-erhaltenden Maßnahmen, wie Kühl-, CA- bzw. ULO-Lagerung oder 1-MCP, an `Elstar` größere Wirkung zeigten als an `Pinova`, was unter anderem daran lag, dass `Pinova` auch in den entsprechenden Kontrollvarianten relativ geringe Veränderungen der Festigkeit aufwies. Die Untersuchungen zeigten zudem, dass die Textureigenschaften der Sorte `Pinova` sich bereits zum optimalen Erntetermin für Langzeitlagerung deutlich von denen der Sorte `Elstar` durch eine um ca. 10 bis 15 N höhere Fruchtfleischfestigkeit unterscheiden. Nach Johnston et al. (2002a) stellen die Form und Größe der Zellen, die Zelldichte sowie die

Anatomie der Frucht bereits Voraussetzungen für spätere Textureigenschaften dar. Nach Harker et al. (1997) weisen Früchte mit größeren Zellen und mehr Interzellularräumen in der Regel ein schwächeres Gewebe auf als Früchte mit kleineren Zellen bzw. kleineren Interzellularen. Es gibt Anzeichen dafür, dass früher reifende Sorten größere Zellen, größere Interzellularräume und eine geringere Gewebedichte aufweisen als später reifende Sorten und dadurch häufig schneller weich werden (Kahn und Vincent, 1990). Dies scheint plausibel, zumal es sich bei den heutigen festfleischigeren Apfelsorten wie `Braeburn`, `Kanzi` oder `Fuji` vor allem um später reifende Genotypen handelt. Dies lässt zumindest eine teilweise Erklärung der Unterschiede zwischen den Sorten `Elstar` und `Pinova` zu. Entgegen diesen Vermutungen konnten McAtee (2009) in Untersuchungen an fünf verschiedenen Apfelsorten keine Korrelation zwischen Zellgröße und Fruchtfleischfestigkeit innerhalb der selben Sorte sowie zwischen den einzelnen Genotypen feststellen. Die Autoren konnten jedoch beobachten, dass vor allem Sorten mit eher "eckigen" Zellformen ein festeres Fruchtfleisch aufwiesen. Mikroskopische Untersuchungen ließen dabei außerdem erkennen, dass die festere Sorte `Jazz`TM im Vergleich zu der weicheren Sorte `Pacific Rose`TM eine höhere Zelldichte und einen damit größeren Zell-zu-Zell-Kontakt aufwies. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Lapsley et al. (1992), die an `Granny Smith` Äpfeln dichter gepackte Zellen im Vergleich zu den runderen Zellen der weicheren Sorte `Rubinette` beobachteten. Entgegen den Ausführungen von Harker et al. (1997) konnten Mann et al. (2005) in einem Vergleich von 10 verschiedenen Apfelsorten mit unterschiedlichen Textureigenschaften feststellen, dass vor allem Früchte mit geringerer Zelldichte, wie `Honeycrisp` knackiger waren als Äpfel mit hoher Zelldichte. Um zellanatomische Unterschiede zwischen den Sorten `Elstar` und `Pinova` zu klären, müssten in weiterführenden Versuchen histologische Untersuchungen zur Beschaffenheit der Zellen durchgeführt werden.

Ein weiterer Textur-bestimmender Aspekt könnten Unterschiede im Zellturgor-Potential beider Sorten sein, wie Tong et al. (1999) an den Sorten `Honeycrisp`, `Golden Delicious`, `Honeygold`, sowie `Macoun` feststellten. An den beiden erstgenannten Sorten war dabei in Korrelation mit der Fruchtfleischfestigkeit ein deutlich besserer Erhalt des Zellturgors während 6 Monaten Kühlung zu beobachten als bei den anderen beiden Sorten.

`Elstar` und `Pinova` zeigten in den durchgeführten Untersuchungen etwa vergleichbare Respirationsraten. Die Ethylenproduktion war bei beiden Sorten unmittelbar nach der Ernte eher niedrig, nahm jedoch bei `Elstar` während des Shelf-life bzw. der Lagerung deutlich stärker zu als bei `Pinova`. Unterschiede zwischen den Ernteterminen waren bei `Elstar` deutlicher ausgeprägt als bei `Pinova`, sowohl unmittelbar nach der Ernte als auch nach unterschiedlich langer Lagerung. Nach Johnston et al. (2001; 2002) gibt es bei Apfelsorten drei verschiedene "Softening"-Typen. Typ 1, zu dem Sorten wie `Royal Gala` oder `Cox Orange` zählen, zeigen eine rasche Abnahme der Festigkeit nach der Ernte, auch ohne vorherigen Kälteimpuls oder Ethylenbehandlung. An `Granny Smith`, welche zu Reaktionstyp 2 zählt und in der Regel eine nur langsame Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit zeigt, konnte Johnston et al. (2002b) eine Induzierung der autokatalytischen Ethylensynthese sowie ein beschleunigtes Weichwerden durch vorherige Temperatur (0,5°C)- oder Ethylenbehandlung ($100 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$ für 24 h) nachweisen. Bei der Sorte `Pacific Rose`, welche zu Typ 3 zählt, veränderten sich hingegen die Ethylensynthese sowie der Festigkeitsverlust durch vorhergehende Temperatur oder Ethylenbehandlung nicht.

`Pinova` zeigte in der vorliegenden Arbeit unmittelbar nach der Ernte eine Abnahme der Ethylenproduktion, wogegen bei `Elstar` ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen war. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte ebenfalls in der unterschiedlichen Reaktionsempfindlichkeit beider Sorten auf Ethylen liegen. Trotz anfangs vergleichbar, niedriger Ethylenproduktion nahm bei `Pinova` die Menge an gebildetem Ethylen mit zunehmender Dauer des Shelf-lifes ab. Vermutlich bewirken bei `Elstar` bereits geringe Mengen an Ethylen eine Steigerung der autokatalytischen Ethylensynthese, wogegen `Pinova`, ähnlich der Sorte `Pacific Rose`, eine geringe Sensitivität für Ethylen besitzt. Dass sowohl bei `Elstar` wie auch bei `Pinova` Ethylen jedoch eine entscheidende Rolle spielt, konnte durch den reifehemmenden und dadurch den Festigkeitserhalt verbessernden Effekt der Behandlung mit 1-MCP nachgewiesen werden. Dennoch zeigten insgesamt alle reifeverzögernden und letztlich Ethylensynthese oder -wirkung inhibierenden Maßnahmen, wie die Lagerung unter CA- und ULO-Bedingungen oder die Applikation von 1-MCP an `Elstar` eine deutlich intensivere Wirkung als an `Pinova`.

Handelt es sich bei `Elstar` tatsächlich um eine Sorte mit ausgeprägter Ethylen-Sensitivität, so wäre in den Versuchen mit Ethylenbehandlungen zunächst eine deutliche Reaktion der Äpfel bezüglich Respiration, Ethylenproduktion oder Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit zu erwarten gewesen. In den Untersuchungen von Johnston et al. (2002b) führte bei `Granny Smith` die Behandlung mit Ethylen zwar zur Induzierung der Ethylensynthese und zum beschleunigten Festigkeitsverlust ohne vorherige Kältebehandlung, jedoch trat dieser Effekt erst 15 bis 20 Tage verzögert nach der entsprechenden Applikation auf. Dies würde erklären, warum in der vorliegenden Arbeit eine dauerhafte Ethylenapplikation zumindest während längerer Lagerung mit zwei bis drei wöchentlichen Applikationen eine, wenn auch geringe, fördernde Wirkung auf die Ethylenproduktion während der anschließenden Nachlagerphase hatte, wogegen eine Applikation erst zu Beginn des Shlef-lifes keinen Effekt zeigte. Unter Umständen führte auch bei `Elstar` ähnlich wie von Johnston et al. (2002b) an `Granny Smith` beschrieben der Kältereiz durch die Lagerung bei 1°C zusätzlich zu einer teilweisen Induzierung der Ethylensynthese. Unterschiede zwischen den beiden Sorten bezüglich Ethylenbildungsrate sind unter anderem vermutlich auf unterschiedliche Intensitäten der Bildung von Ethylen-Vorstufen (ACC) zurückzuführen. Larrigaudiere et al. (1997) konnten an `Granny Smith` einen Anstieg des 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC)-Level nach erfolgter Temperaturbehandlung (4°C) und anschließendem Überführen der Früchte in 20°C feststellen. Zudem korrelierte der klimakterische Ethylenanstieg während der Lagerung bei 20°C in Apfelfrüchten mit dem Anstieg an ACC-Oxidase-Aktivität, wobei reifere Früchte mehr Ethylen bildeten bzw. eine höhere ACC-Oxidase-Aktivität aufwiesen als früher geerntete Früchte. Bezüglich der Ethylenbildungsrate konnten ähnliche Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit vor allem bei der Sorte `Elstar` gemacht werden, bei `Pinova` dagegen hatte der Erntetermin einen geringeren Einfluss auf die Ethylenbildung. Ein verzögertes Eintreten des klimakterischen Ethylenanstiegs in weniger reifen Früchten hängt, wie von Yang und Hoffmann (1984) diskutiert, womöglich mit dem verzögerten Abbau eines Reifeinhibitors zusammen. In den vorliegenden Versuchen zeigten `Elstar` Äpfel des früheren Erntetermins nach 9 Monaten Lagerung eine erhöhte Ethylenproduktion im Vergleich zu den später geernteten Früchten aus dem Kühllager. Dies lässt sich vor allem durch eine "Überreife" der Äpfel erklären. Vergleichbar konnte Larrigaudiere et al. (1999) in

Untersuchungen mit `Granny Smith` im Verlauf von 30 Tagen bei 20°C an unreifen Früchten nur geringe Level an ACC sowie MACC (Malonyl ACC) messen. Bei den zum optimalen Termin geernteten Äpfeln stieg die Menge an ACC zunächst deutlich an und nahm nach ca. 17 Tagen wieder ab, während gleichzeitig die Menge an MACC anstieg. Dagegen blieb bei den überreif geernteten Früchten die ACC-Konzentration während der 30 Tage vergleichsweise niedrig, während MACC stetig zunahm. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei `Elstar` in dieser Arbeit konnten Larrigaudiere et al. (1999) bei Lagerung der Früchte bei 1°C keine Unterschiede zwischen den Reifegraden feststellen. Früchte aller drei Erntetermine zeigten ein ähnliches Verhalten bezüglich Ethylenproduktion und ACC-Aktivität. Die Autoren schlossen daraus, dass das Ethylenbildungsvermögen unreifer Äpfel möglicherweise auf eine zunehmende Aktivität der ACC-Oxidase verursacht durch niedrige Temperaturen zurückzuführen ist.

Würden niedrige Temperaturen bei `Elstar` ähnlich wie bei `Granny Smith` eine Induzierung der Ethylensynthese bewirken, wären nach 9 Monaten Lagerung vermutlich keine Unterschiede zwischen den Ernteterminen zu beobachten gewesen. Dies deutet darauf hin, dass `Elstar` im Vergleich zu `Pinova` zwar scheinbar eine höhere Sensitivität für Ethylen besitzt, niedrige Temperaturen für die Induzierung der Ethylensynthese jedoch keine oder nur eine geringe Rolle zu haben scheinen. Nach Harkett et al. (1971) nimmt die Sensitivität für Ethylen bei Äpfeln mit zunehmendem Reifegrad zu, was in der vorliegenden Arbeit auch die deutlich zunehmende Ethylenproduktion mit längerer Lagerdauer bei beiden Sorten zeigte. Nach Harada et al. (2000) hängt eine niedrige Ethylenproduktion bestimmter Apfelsorten mit einer Mutation der Allele von ACS1, einem der wichtigsten Gene für die Ethylenproduktion während der Reife, zusammen. In einem Vergleich von 35 verschiedenen Apfelsorten konnten sie feststellen, dass 11 der untersuchten Sorten, welche homozygot bezüglich dem Allel ACS1-2 waren, deutlich weniger internes Ethylen bildeten als Sorten, welche homo- oder heterozygot für das Allel ACS1-1 waren. Nach Harada et al. (2000) könnte Md-ACS1-2, dessen Promotor bei der Insertion mutiert wird, in Zusammenhang mit der langen Lagerfähigkeit bestimmter Apfelsorten, wie der Sorte `Pinova` in der vorliegenden Arbeit, stehen. Auch Costa et al. (2005) konnten in Untersuchungen mit verschiedenen Kreuzungen nachweisen, dass vor allem Apfelsorten, die homozygot

bezüglich Md-ACS1-2 sowie Md-ACO1-1 waren, eine geringere Ethylenproduktion sowie einen besseren Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit aufweisen als die Vergleichssorten. Am stabilsten während des Shelf-lifes zeigten sich dabei diejenigen Abkömmlinge, bei denen beide Allele, Md-ACS1 und Md-ACO1, fehlten.

Hinweise auf sortenabhängige Unterschiede bezüglich der Sensitivität für Ethylen sind in der Literatur ebenfalls zu finden (z.B. Johnston et al. 2002b; Tatsuki und Endo, 2006), jedoch gibt es kaum Hinweise auf Untersuchungen, in denen vergleichsweise die Sensitivität verschiedener Sorten tatsächlich gemessen werden konnte. Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Genotypen auf Ethylen könnte unter Umständen auf eine unterschiedliche Dichte bzw. Anzahl an Ethylenrezeptoren in der Zellmembran oder auf Unterschiede in der Signalübertragung nach Aktivierung der Rezeptoren durch Ethylen zurückzuführen sein. Nach Binder und Bleeker (2003) handelt es sich bei der Wirkungsweise von Ethylen an den Rezeptoren um ein negativ reguliertes Modell. Das bedeutet, dass Sorten mit geringerer Anzahl an Rezeptoren empfindlicher auf Ethylen reagieren und dadurch eine geringere Menge des Hormons notwendig wäre, um durch Unterbrechung des inhibitorischen Zustands der Rezeptoren über Inaktivierung des CRT1-Proteins und folglich Aktivierung von EIN2 ethylenbezogene Reifeprozesse zu induzieren. Tatsuki und Endo (2006) konnten an `Fuji` und `Orin` Äpfeln, zwei Sorten mit unterschiedlichem Shelf-life, drei mögliche Ethylenrezeptor-Gene, Md-ETR1, Md-ERS1 sowie Md-ERS2, isolieren und deren Expression messen. Bei beiden Sorten hatte 1-MCP eine inhibierende Wirkung auf die Ethylenproduktion sowie die Genexpression von Md-ERS1 und Md-ERS2. Unterschiede zwischen den beiden Sorten bestanden jedoch vor allem darin, dass bei `Fuji`, der Sorte mit längerem Shelf-life, mehr Md-ERS1 und Md-ERS2 mRNA akkumuliert wurde als bei `Orin`. Da es sich bei der Ethylen-Signalübertragung an den Rezeptoren, wie bereits erwähnt, um einen negativ regulierten Wirkungsmechanismus handelt, schlossen die Autoren, dass die Ethylensensitivität der jeweiligen Sorten in Zusammenhang mit dem Expressionslevel der Rezeptoren steht. Eine Bestimmung der Sensitivität verschiedener Sorten wäre evtl. möglich, indem man Veränderungen der Genexpression von Md-ERS1 und Md-ERS2 nach Applikation verschiedener Ethylen-Konzentrationen misst.

Bezüglich der Genexpression der meisten untersuchten zellwandabbauenden Enzyme wurden bei `Elstar` deutlich höhere Werte gemessen als bei `Pinova`. Dies deckt sich mit den Ergebnissen niedrigerer Festigkeitswerte bei `Elstar`, einer schnelleren Abnahme an extrahierbarem Zellwandmaterial sowie eines intensiveren Anstiegs an gelösten (PAW-löslichen) Pektinen im Vergleich mit `Pinova`. Das bedeutet, dass der Abbau der Zellwand bei `Pinova` im Vergleich zu `Elstar` deutlich verzögert abläuft. Nach der Anwendung von 1-MCP zeigte sich bei den meisten Enzymen eine Inhibierung der Genexpression bzw. Enzymaktivität verbunden mit einem reduzierten Abbau der Fruchtfleischfestigkeit (siehe auch Diskussion Kapitel 5.3). Dies ist ein klarer Hinweis dafür, dass Ethylen für die Regulierung der am Zellwandabbau beteiligten Enzyme eine zentrale Rolle spielt.

Die höheren Expressionswerte von Md-PG2 bei `Elstar` widersprechen zunächst den Aussagen in der Literatur, wonach beim Apfel als Frucht mit nur sehr geringer endo-Polygalacturonase-Aktivität keine oder eine nur sehr geringfügige Depolymerisation des Pektins erfolgt (Redgwell und Fischer, 2002). Eventuell beruht die an Äpfeln fehlende Depolymerisation des Pektins sowie der häufig fehlende Nachweis von PG-Aktivität auf der Tatsache, dass der Proteingehalt im Apfelgewebe ca. 50-100-fach niedriger ist als in Tomaten, wie von Wu et al. (1993) bemerkt wird. Dies könnte dazu führen, dass zwar eine Expression der entsprechenden PG-kodierenden Gene gemessen werden kann, diese jedoch nicht für eine messbare Enzymaktivität oder Depolymerisation des Pektins ausreicht. Dennoch konnte an Äpfeln von verschiedenen Autoren auch PG-Aktivität nachgewiesen werden (Liang et al., 1982; Kramer et al., 1992). Die in dieser Arbeit beobachteten niedrigeren Expressionswerte bei der Sorte `Pinova` entsprechen Ergebnissen von Wakasa et al. (2006), der bei einem Vergleich von 14 verschiedenen Apfelsorten feststellen konnte, dass alle Sorten mit sehr gutem Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit eine sehr schwache Expression des für die Polygalacturonase kodierenden Gens MdPG1 aufwiesen, dies jedoch unabhängig von der Ethylenbildungsrate der jeweiligen Sorte war.

Hätte eine Aktivität der Polygalacturonasen in der vorliegenden Arbeit Einfluss auf die Depolymerisation der Pektine gehabt, so wäre in den Zellwandfraktionierungen während der Lagerung eine Abnahme an kovalent gebundenen, Na_2CO_3 -löslichen Pektinen und dabei ein

intensiverer Rückgang bei `Elstar` als bei `Pinova` zu erwarten gewesen. Paull et al. (1999) konnten zum Beispiel an Papaya Früchten eine Abnahme an Na_2CO_3 -löslichen Pektinen während der Fruchtreife durch eine Depolymerisation der Pektine mittels Polygalacturonasen beobachten. An `Elstar` und `Pinova` hingegen wurde während der Lagerung eine Zunahme an Na_2CO_3 -löslichen Pektinen festgestellt, wobei zwischen den beiden Sorten keine Unterschiede vorlagen. Dieser Anstieg ist vermutlich auf eine zunehmende Extrahierbarkeit der Pektine mit zunehmender Reife zurückzuführen. Es wäre denkbar, dass die Aktivität von Xyloglucan-Endotransglycosylasen sowie Expansin durch das Lösen von Zellulose-Hemizellulose-Verbindungen zu einer zunehmenden Extrahierbarkeit der Pektine beiträgt.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede bezüglich der Genexpression der β -Galactosidase (Md- β GS) zwischen den beiden Sorten entsprechen Ergebnissen von Wei et al. (2010) mit `Golden Delicious` und `Fuji`. `Elstar` zeigte nach 10 Tagen Shelf-life bei 20°C im Anschluss an die Ernte deutlich höhere Expressionswerte als `Pinova`. An `Pinova` war nur eine minimale Expression von Md- β GS zu messen. Ähnlich konnten Wei et al. (2010) bei `Golden Delicious`, der Sorte mit schnellerer Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit, höhere Werte der Genexpression sowie einen deutlich rascheren Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität messen als bei `Fuji`. Goulao et al. (2008) führten als eine mögliche Ursache für das frühere Weichwerden der Sorte `Gala` im Vergleich zu der festfleischigen Sorte `Granny Smith` eine frühere Transkription von pABG1-homologer RNA, eines für die Aktivität der β -Galactosidase kodierenden Gens, an. Ähnlich könnten die höheren Expressionslevel von Md- β GS bei `Elstar` am Ende des Shelf-lifes auf ein zeitlich früheres Einsetzen der Genexpression zurückzuführen sein. Jedoch wies `Pinova` auch nach Kühl- und CA-Lagerung nur sehr geringe Md- β GS-Expressionswerte auf. `Elstar` zeigte während der Lagerung einen rascheren Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität als `Pinova`. Veränderungen der β -Galactosidase-Aktivität korrelierten bei beiden Sorten mit der jeweiligen Abnahme der Fruchtfleischfestigkeit. Dies deckt sich mit Aussagen von Bartley et al. (1974) sowie Wallner (1978), wonach das Weichwerden bei Äpfeln mit einem Rückgang des Galactosegehaltes in der Zellwand und einem Anstieg an β -Galactosidase-Aktivität in Verbindung steht. Ein Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität während der Lagerung bzw. der physiologischen Reife

von Äpfeln wurde unter anderem auch von Ortiz et al. (2011) sowie Goulao et al. (2007) beschrieben.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit bezüglich der Aktivität der β -Galactosidase stimmen vor allem auch mit den Messungen aus den Zellwandfraktionierungen überein. Bei `Pinova` waren bereits zur Ernte deutlich höhere Mengen an gesamtem Zellwandmaterial bezogen auf die Trockensubstanz des Fruchtgewebes extrahierbar als bei `Elstar`, was auf eine höhere Zelldichte oder auf dickere Zellwände in dieser Sorte hinweisen könnte. Während der Lagerung bei 10°C zeigten beide Sorten eine ähnliche Abnahme an extrahierbarem Zellwandmaterial, vor allem während der ersten 5 Wochen, jedoch blieben die Unterschiede bis zum Lagerende nach 10 Wochen erhalten. Die deutlich höheren Anteile an bereits gelösten Pektinen (PAW-lösliche Fraktion) bei `Elstar` weisen darauf hin, dass bei dieser Sorte der Abbau der Zellwände bereits früher einsetzt als bei der Sorte `Pinova`. Die durch β -Galactosidasen bewirkte Abspaltung der Galactan-Seitenketten, überwiegend an den Rhamnoseresten des Rhamnogalacturonan I-Abschnittes des Pektinmoleküls (Carpita und Gibeaut, 1993), führt zur Solubilisierung des Pektins. Diese zunehmende Lösbarkeit konnte in der vorliegenden Untersuchung bei beiden Sorten deutlich beobachtet werden, wobei die Zunahme an gelösten Pektinen während des Shelf-lifes bei `Elstar` ausgeprägter war als bei `Pinova` und deutlich mit dem jeweiligen Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität bei beiden Sorten korrelierte. Dies deutet darauf hin, dass β -Galactosidasen bei den beiden untersuchten Sorten eine wichtige Rolle für das Lösen von Pektinen in der Zellwand und somit für den Verlust an Fruchtfleischfestigkeit spielen. Billy et al. (2008) untersuchten an `Fuji` und `Golden Delicious` Äpfeln Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit während der Lagerung in Kombination mit Analysen zur Veränderung der Pektinfraktionen. Dabei konnten sie bei beiden Sorten eine Abnahme an neutralen Zuckern in der alkohol-unlöslichen Zellwandfraktion feststellen, was nach Yoshikoa et al. (1994) vor allem auf eine Abnahme des Gehaltes an Galaktose und Arabinose zurückzuführen ist. Bei `Golden Delicious` setzte die größenordnungsmäßige Abnahme der neutralen Zucker tendenziell etwas früher ein als bei `Fuji`. Dies unterstreicht die Bedeutung von Glycosidasen, vor allem der β -Galactosidasen sowie der Arabinofuranosidasen, für das Weichwerden bei Äpfeln. In der wasserlöslichen Zellwandfraktion konnten die Autoren bei `Fuji` ebenfalls eine Abnahme an

neutralen Zuckern während der Lagerung messen, wogegen an `Golden Delicious` überraschenderweise diesbezüglich keine Veränderungen beobachtet wurden (Nara et al., 2001).

Unterschiede zwischen `Elstar` und `Pinova` bezüglich der Genexpression sowie der Aktivität der β -Galactosidasen führen vermutlich neben weiteren Faktoren zu Unterschieden im Festigkeitsverlust beider Sorten. Die Beobachtung, dass 1-MCP die Genexpression und Aktivität der β -Galactosidase bei beiden Sorten deutlich inhibierte, legt die Annahme nahe, dass das Enzym durch Ethylen reguliert wird und eine Ursache für die Expression bzw. Aktivität in der jeweiligen Ethylenbildungsrate oder Sensivität für Ethylen der beiden Sorten zu finden ist (siehe Kapitel 5.3).

Neben β -Galactosidasen gehören Arabinofuranosidasen zu den wichtigsten Glycosidasen. Beide Enzyme katalysieren die Abspaltung neutraler Zucker, Galaktose und Arabinose, von den Seitenketten der Rhamnosylreste am Hauptgerüst des Rhamnogalacturonan-Abschnittes (Redgwell, 1997). Sie spielen deshalb eine wichtige Rolle für die Adhäsion der Polysaccharide untereinander und für die Stabilität der Mitellamelle (Tateishi, 2008). Die Expression von Md-AFase, einem für die Aktivität der Arabinofuranosidase kodierenden Gen, war in den vorliegenden Untersuchungen bei `Elstar` deutlich höher als bei `Pinova`. Ähnlich konnte Wei et al. (2010) an `Golden Delicious` eine höhere Aktivität der Arabinofuranosidase feststellen als an `Fuji`. Auch war die Wirkung von 1-MCP sowie niedrigen Temperaturen, wie bei `Elstar`, an `Golden Delicious` ausgeprägter als an `Fuji`. 1-MCP wirkte in der vorliegenden Arbeit bei beiden Sorten auch inhibierend auf die Genexpression der Arabinofuranosidase, was zeigt, dass Ethylen für die Regulierung der Genexpression des Enzyms eine wichtige Rolle spielt.

Zur Genexpression von Pektinmethylesterasen wurden in dieser Arbeit keine Analysen durchgeführt, jedoch erfolgten Messungen zur Aktivität des Enzyms. `Pinova` zeigte zur Ernte und während der Lagerung höhere PME-Aktivität als `Elstar`. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Zellwandfraktionierungen. Dabei nahm der Anteil an ionisch gebundenen Pektinen bei `Pinova` nach längerer Lagerung deutlich zu, was vermutlich mit der höheren gemessenen Pektinmethylesterase-Aktivität im Vergleich zu

‘Elstar’ zusammenhängt. Durch die Abspaltung der Methylester am Pektin mittels Pektinmethylesterasen entstehen freie Carboxylgruppen, welche die Bildung von Ca^{2+} -Quervernetzungen zwischen den Pektinmolekülen über ionische Bindungen ermöglichen, was zu einer Festigung der Zellwand, vor allem während der späteren Reifephase bzw. während des Shelf-lifes führen kann (Phan et al., 2007). Nach 5 Wochen Lagerung bei 10°C konnte in der vorliegenden Arbeit an ‘Pinova’ die höchste Aktivität der Pektinmethylesterase gemessen werden. Ab diesem Zeitpunkt nahm der Gehalt an ionisch gebundenen Pektinen deutlich zu, auch wenn die Enzymaktivität währenddessen wieder abnahm. Der höhere Anteil an ionisch mittels Ca^{2+} -Brücken gebundenen Pektinen und die dadurch verbesserte Stabilität der Mittellamelle könnte an ‘Pinova’ ein Grund für die im Vergleich geringere Abnahme der Festigkeit während der Lagerung, aber vor allem während des Shelf-lifes sein. Vergleichbar konnte Billy et al. (2008) an der festfleischigen Apfelsorte ‘Fuji’ eine deutliche Abnahme des Methylierungsgrades der Pektine gegen Ende der Lagerung nach 4 bis 7 Monaten feststellen, was ebenfalls auf eine höhere Aktivität der Pektinmethylesterase zurückzuführen sein könnte und somit, ähnlich wie bei ‘Elstar’ und ‘Pinova’, teilweise das bessere Shelf-life der Sorte gegenüber ‘Golden Delicious’ erklären würde. Ob die höhere PME-Aktivität bei ‘Pinova’ Einfluss auf die Substratverfügbarkeit der Polygalacturonasen hatte, wie von zahlreichen Autoren (Koch und Nevins, 1989; Carpita und Gibeaut, 1993) beschrieben, konnte nicht geklärt werden, da keine Messungen der PG-Enzymaktivität durchgeführt wurden. Da jedoch die Genexpressionswerte von Md-PG2 in ‘Elstar’ um ein Vielfaches höher waren als in ‘Pinova’, ist davon auszugehen, dass ein PG-Substratverfügbarkeit-fördernder Effekt der Pektinmethylesterasen keinen oder nur minimalen Einfluss auf die Aktivität der Polygalacturonasen hatte, bzw. dass dieser keine messbare Wirkung auf den Festigkeitsverlust der Früchte zeigte. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Tieman und Handa (1994) mit transgenen antisense Tomaten. Dabei hatte die Unterdrückung der PME-Aktivität während der normalen Reifephase keinen positiven Einfluss auf die Fruchtfleischfestigkeit, führte jedoch in überreifen Früchten zu einem deutlich intensiveren Verlust der Gewebestabilität im Vergleich zum Wildtyp. Die vorliegenden Ergebnisse mit ‘Elstar’ und ‘Pinova’ stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Wei et al. (2010), der an der festfleischigen Sorte ‘Fuji’ im Vergleich zu der schneller

weichwerdenden Sorte `Golden Delicious` einen geringeren Anstieg der PME-Aktivität feststellte. Betrachtet man die PME-Aktivität in der vorliegenden Arbeit, so weist `Pinova` bereits zur Ernte deutlich höhere gemessene Werte auf als `Elstar`. Bedenkt man, dass in den Zellwandfraktionierungen an `Pinova` zur Ernte höhere Gehalte an extrahierbarem Zellwandmaterial erfasst wurden, so könnte man die Höhe der PME-Aktivität im Verhältnis zur Menge an Zellwandmaterial bewerten, was bedeuten würde, dass bei höherer Menge an Zellwandmaterial entsprechend höhere Aktivität eines Enzyms notwendig wäre, um vergleichbare Änderungen der Zellwandstrukturen zu bewirken. In diesem Fall würde an `Elstar` bereits eine geringere PME-Aktivität ausreichen um zum Beispiel mittels Spaltung der Methylester an den Pektinen zu deren Solubilisierung beizutragen. Entsprechend den Beobachtungen von Wei et al. (2010) führte 1-MCP zu einer deutlichen Inhibierung der PME-Aktivität bei beiden Sorten (siehe Kapitel 5.3).

Xyloglucan-Endotransglycosylasen sowie Expansin wirken auf das Zellulose-Hemizellulose Netzwerk in der Zellwand und können so eine wichtige Rolle für Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit spielen. In den vorliegenden Untersuchungen wurden Bestimmungen der Genexpression von Md-XTH2 sowie Md-XTH10 durchgeführt. Atkinson et al. (2009) konnte unter insgesamt 11 isolierten XTH-Genen bei der Sorte `Granny Smith` feststellen, dass in reifen Früchten vor allem diese beiden Gene exprimiert werden. In den meisten Untersuchungen zur Aktivität der Xyloglucan-Endotransglycosylasen konnte vor der Ernte ein Anstieg der Enzymaktivität gemessen werden, der nach der Ernte wieder abnahm (Percy et al. 1996; Vincken et al., 1998) oder auf gleich hohem Niveau blieb (Goulao et al., 2007). Ähnliches konnte in der vorliegenden Arbeit bezüglich Md-XTH10 bei `Elstar` und `Pinova` beobachtet werden. Zur Ernte wurde bei beiden Sorten das höchste Expressionsniveau gemessen, anschließend nahm dieses ab. Im Gegensatz dazu stieg die Expression von Md-XTH2 tendenziell an. `Elstar` wies im Anschluss an 10 Tage Shelf-life unmittelbar nach der Ernte eine niedrigere Expression von Md-XTH2, jedoch ein höheres Expressionslevel von Md-XTH10 auf. Zusätzliche Untersuchungen zur Aktivität des Enzyms könnten Aufschluss darüber geben, welche Bedeutung die beiden Gene während der Fruchtreife bei beiden Sorten spielen. Unterschiede bezüglich der Expression verschiedener Xyloglucan-Endotransglycosylase-kodierender Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten der

Fruchtentwicklung und Reife konnten unter anderem an Tomaten von Asada et al. (1999) sowie Brummel und Harpster (2001) bzw. an Äpfeln von Goulao et al. (2008) und Atkinson et al. (2009) beobachtet werden. Es wäre möglich, dass verschiedene Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fruchtentwicklung und –reife Bedeutung für die Aktivität der Xyloglucan-Endotransglycosylase spielen und diese im Einzelfall nicht zwingend mit dem Verlust an Fruchtfleischfestigkeit in Verbindung steht. Ethylen scheint bei beiden Sorten die Genexpression der Xyloglucan-Endotransglycosylase zu beeinflussen, da 1-MCP Md-XTH2 bei `Elstar` und `Pinova` bzw. Md-XTH10 bei `Pinova` inhibierte. Welche Rolle letztendlich Xyloglucan-Endotransglycosylasen für die Fruchtfleischfestigkeit beider Sorten spielen, ist noch unklar, zumal nach Angaben in der Literatur beim Apfel keine messbare Depolymerisation der Hemizellulosen zu erfolgen scheint (Siddiqui et al. 1996; Percy et al. 1997). Es wäre jedoch denkbar, dass das Enzym durch eine teilweise Lockerung der Zellwand bzw. der Netzwerkstrukturen zwischen Zellulosen und Hemizellulosen zusammen mit Expansin Einfluss auf die Aktivität weiterer zellwandabbauender Enzyme und somit indirekt auf die Solubilisierung der Pektinmoleküle hat.

Die Genexpression von Expansin (Md-Exp2) war bei `Elstar` deutlich höher als bei `Pinova`. Der schnellere Verlust an Fruchtfleischfestigkeit bei `Elstar` könnte somit unter anderem auf eine intensivere Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulose-Mikrofibrillen und Xyloglucanen zurückzuführen sein, wodurch es zu einer stärkeren Lockerung des Zellulose-Hemizellulose-Netzwerkes in der Zellwand kommt. Rose et al. (1997) beobachteten in Untersuchungen an Tomaten, dass die Expression des Expansin kodierenden Gens Le-Exp1 durch Ethylen reguliert wird. An Äpfeln konnten Wakasa et al. (2003) eine Zunahme der Expression des Expansin kodierenden Gens Md-Exp3 mit dem klimakterischen Anstieg der Ethylenproduktion beobachten. Gleichzeitig inhibierte 1-MCP fast vollständig die Expression des Gens. Dies entspricht auch den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. Die Applikation von 1-MCP inhibierte deutlich die Genexpression von Md-Exp2 bei beiden Sorten, was auf eine Regulierung der Genexpression des Enzyms durch Ethylen hinweist (siehe Kapitel 5.3).

5.2 Einfluss der Lagermethode auf Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau

In der vorliegenden Arbeit sollten Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit in Zusammenhang mit dem Zellwandabbau während der Lagerung genauer untersucht werden, um unter anderem ein verbessertes Verständnis der den Festigkeitsverlust bestimmenden Prozesse zu bekommen. Deshalb war es notwendig, in den durchgeführten Untersuchungen die verschiedenen praxisüblichen Lagerverfahren, wie die Kühlagerung oder die Lagerung bei geregelter Atmosphäre (CA-Lager) bzw. bei extrem niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (ULO-Lager) anzuwenden. Da die Wirkung der genannten Lagerverfahren auf die Fruchtfleischfestigkeit, wie in Kapitel 2.5.2.2 beschrieben, vor allem auf einer Inhibierung der Ethylensynthese und -wirkung sowie der Respiration der Früchte beruht, dienten die durchgeführten Untersuchungen unter anderem dazu, die Rolle von Ethylen für die Texturbestimmenden bzw. verändernden Prozesse genauer zu betrachten.

Der in zahlreichen früheren Untersuchungen beobachtete Einfluss von Lagertemperatur sowie CA- bzw. ULO-Bedingungen auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit sowie die Respiration und Ethylenproduktion der Früchte konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Ein inhibierender Effekt niedriger Temperaturen, niedriger O₂- sowie erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Respiration und Ethylenbildung bzw. -wirkung bei Äpfeln und anderen klimakterischen Fruchtarten wurde von vielen Autoren beschrieben (z.B. Kidd und West, 1927; Burg und Burg, 1962; Streif 1978; Brackmann 1995; Stow, 2000).

Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Einfluss der Temperatur und Lagermethoden auf Fruchtfleischfestigkeit, Reifeverhalten, Genexpression und Aktivität zellwandabbauender Enzyme sowie auf den Abbau von Pektinstrukturen bei den Apfelsorten `Elstar` und `Pinova` nachgewiesen werden, wobei die Wirkung an `Elstar` grundsätzlich ausgeprägter war als an `Pinova`. Die Lagerung unter CA- bzw. ULO-Bedingungen im Vergleich zu Kühlager in Normalatmosphäre führte zu einem deutlich besseren Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit während der Lagerung, wobei an `Pinova` kaum Unterschiede zwischen beiden (CA/ULO) Lagermethoden beobachtet werden konnten. Der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit nahm erwartungsgemäß mit steigender Lagertemperatur zu, wobei entsprechende Maßnahmen, wie die Lagerung unter CA-Bedingungen oder der Einsatz von

1-MCP diesen Temperatureffekt, vor allem bei `Pinova` deutlich abschwächten. Sowohl CA- als auch ULO-Lagerung wirkten sich an beiden Sorten positiv auf das Shelf-life nach der Lagerung aus. Die beste Wirkung bezüglich des Erhalts der Fruchtfleischfestigkeit konnte bei Kombination von ULO-Lagerung und der Applikation von 1-MCP erzielt werden. Allerdings brachte bei `Pinova` auf Grund der hohen Lagerstabilität der Sorte unter CA- und ULO-Bedingungen die 1-MCP Behandlung kaum einen zusätzlichen Effekt.

Neben dem direkten Einfluss der Temperatur auf die an der Reife sowie den Stoffwechselprozessen beteiligten Enzyme, wirken alle reifeverzögernden Maßnahmen vor allem über eine Inhibierung der Ethylenproduktion und –wirkung (Banks et al. 1984; Bufler und Streif, 1986) sowie der Respiration (Watkins, 2002). Die Verzögerung des klimakterischen Ethylenanstiegs durch niedrige Temperaturen konnte zum Beispiel von Kneen et al. (1983) nachgewiesen werden. Larrigaudierre et al. (1997) konnten an verschiedenen Apfelsorten zeigen, dass eine Absenkung der Temperatur inhibierend auf die Enzyme der Ethylenbiosynthese, ACC-Synthase und ACC-Oxidase, wirkte.

An `Elstar` und `Pinova` bewirkte die Lagerung unter CA- sowie ULO-Bedingungen eine deutliche Inhibierung sowohl der Respiration als auch der Ethylenbildung. Da `Elstar` nach Kühllagerung vor allem nach längerer Lagerdauer eine deutlich höhere Ethylenproduktion zeigte als `Pinova`, war der inhibierende Effekt der CA- bzw. ULO- Lagerung bei `Elstar` deutlicher ausgeprägt. Eine Regulierung der Respiration durch niedrige O₂ sowie erhöhte CO₂-Konzentrationen erfolgt vor allem über eine Beeinflussung von Glycolyse, Zitronensäurezyklus sowie der Atmungskette durch entweder direkten Einfluss auf die Oxidation der Reduktionsäquivalente aus der Glycolyse, durch direkte Inhibierung der am Atmungsstoffwechsel beteiligten Enzyme oder über einen indirekten, substratlimitierenden Effekt (z.B. Mathooko et al., 1996; Mir und Beaudry, 2002) (siehe Kapitel 2.5.2.2). Durch die Inhibierung des Atmungsstoffwechsels kommt es vor allem zu einer reduzierten Gewinnung von Energie in Form von ATP (Geigenberger, 2003).

Bezüglich der Respiration bzw. der Wirkung der Lagerbedingungen auf den respiratorischen Anstieg der CO₂-Produktion während des Shelf-lifes waren die Unterschiede zwischen `Elstar` und `Pinova` relativ gering, deutliche Unterschiede konnten jedoch vor allem in

Bezug auf die Ethylenproduktion sowie deren Hemmung im Lager beobachtet werden. Niedrige Sauerstoffwerte in der Atmosphäre wirken auf die Ethylensynthese vor allem über eine Hemmung der ACC-Oxidase (Adams und Yang, 1979; John, 1997), wodurch der Syntheseschritt von ACC zu Ethylen unterbunden wird (Li et al. 1983). Auch erhöhte CO₂-Konzentrationen hemmen zusätzlich die ACC-Synthese (Li et al. 1983; Chaves und Thomas, 1984). So konnten Gorny und Kader (1997) an `Golden Delicious` Äpfeln eine Inhibierung der ACC-Synthase mRNA Akkumulation und eine daraus resultierende, geringere Ethylenproduktion nachweisen.

Lagerbedingungen beeinflussen die Fruchtfleischfestigkeit letztendlich durch ihre Wirkung auf die Aktivität zellwandabbauender Enzyme und den daraus resultierenden Veränderungen der Polysaccharidstrukturen in der Zellwand. Respiration und Ethylenproduktion der Früchte spielen dabei eine entscheidende Rolle, da es zum einen denkbar ist, dass die Fruchtatmung einen direkten Effekt auf die Synthese bzw. Aktivität einzelner Enzyme durch Bereitstellung der notwendigen Energie in Form von ATP hat, zum anderen, da Ethylen eine entscheidende regulatorische Rolle für die meisten zellwandabbauenden Enzyme zu spielen scheint. Hinweise darauf liefert der deutlich inhibierende Effekt von 1-MCP auf die Genexpression bzw. Aktivität der meisten in dieser Arbeit analysierten zellwandabbauenden Enzyme (siehe Kapitel 5.3).

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass die Analysen zur Genexpression der zellwandabbauenden Enzyme am Ende der Shelf-life-Periode bei Lagerbeginn und Lagerende durchgeführt wurden. Aussagen über dazwischenliegende Veränderungen der Genexpression sind daher nur bedingt möglich. Zudem war die Lagerdauer in vergleichenden Untersuchungen zwischen `Pinova` und `Elstar` nicht gleich, sondern betrug 8 Monate für `Pinova` und 9,5 Monate für `Elstar`.

Die in den Versuchen festgestellte Zunahme der Genexpression von Md-PG2 während der Lagerung deckt sich mit Beobachtungen von Della Penna et al. (1986) an Tomaten, bei denen die Autoren eine zunehmende Aktivität der Polygalacturonase verbunden mit einer ständigen *de novo* Synthese des Enzyms beobachten konnten. Zudem konnten Tucker et al. (1980) in einem Vergleich von zwei PG-Isoformen an Tomaten feststellen, dass PG-2 vor

allem während der späteren Reife eine Rolle spielt. Dies legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise weitere als die in dieser Arbeit analysierten Isoforme der einzelnen Enzyme im Verlauf der Fruchtreife eine Rolle spielen könnten. Über die Bedeutung der Polygalacturonasen während der späteren Fruchtreife wurde von mehreren Autoren berichtet (z.B. Redgwell und Fischer, 2002). Überraschend war dennoch die höhere Genexpression nach ULO-Lagerung im Vergleich zu Lagerbeginn sowie Kühlungslagerung. Es wäre möglich, dass dieser Effekt auf einen verzögerten Anstieg der Genexpression von Md-PG2 gegenüber den Äpfeln aus dem Kühlungslager zurückzuführen ist und dementsprechend an den Kühlungslagervarianten, bedingt durch die fortgeschrittene Reife, bereits eine Abnahme der Genexpression erfolgte, während nach ULO-Lagerung die Expression noch zunahm. Dies würde auch erklären, warum bei `Elstar` die Expression von Md-PG2 nach 9,5 Monaten Kühlungslagerung niedriger war als unmittelbar nach der Ernte. Die Ergebnisse bezüglich der Genexpression der Polygalacturonase aus den Untersuchungen mit Calciuminfiltrationen stützen diese Hypothese, da bei früherer Auslagerung nach nur 4,5 Monaten die Äpfel aus dem CA-Lager tendenziell ein etwas niedrigeres Expressionslevel aufwiesen als Früchte aus dem Kühlungslager. Ein ähnlicher Effekt der Reife auf die Enzymaktivität der Polygalacturonase konnte von Wei et al. (2010) beobachtet werden. Dabei war in `Golden Delicious`-Äpfeln während der Fruchtreife bei 20°C zunächst ein deutlicher Anstieg der PG-Aktivität bis 42 Tage nach der Ernte zu messen, anschließend nahm diese wieder ab. In 1-MCP behandelten Früchten war die Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert, stieg aber im Laufe der Versuchsperiode kontinuierlich an.

Ein verzögerter Anstieg der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Polygalacturonase während der ULO-Lagerung könnte neben einem direkten Einfluss auf die Expression von Md-PG2 auch auf einen zusätzlichen indirekten Einfluss durch die Aktivität der Pektinmethylesterasen zurückzuführen sein. Geht man davon aus, dass für die Substratverfügbarkeit der Polygalacturonasen tatsächlich eine vorhergehende Abspaltung der Methylester an den Homogalacturonan-Abschnitten des Pektinmoleküls und somit die Aktivität der Pektinmethylesterasen von Bedeutung ist, wie z.B. von Jarvis (1984) sowie Daas et al. (2000) beschrieben, könnte die hemmende Wirkung der ULO-Lagerung auf die Enzymaktivität der Pektinmethylesterase zu einer verzögerten Substratverfügbarkeit und

somit zu einem späteren Anstieg der Genexpression und Enzymaktivität der Polygalacturonasen geführt haben.

Die Rolle des Ethylens für die Genexpression von Md-PG2 zu diesem Zeitpunkt scheint jedoch unklar, da bei beiden Sorten die ULO-Lagerung sowohl mit als auch ohne 1-MCP die Ethylenbildung zwar deutlich inhibierte, die ULO-Varianten ohne 1-MCP aber dennoch eine deutlich höhere Genexpression aufwiesen als die 1-MCP-Varianten. Möglicherweise reichen bereits minimale Unterschiede in der Menge an produziertem Ethylen aus, um deutliche Unterschiede zwischen 1-MCP behandelten und unbehandelten Früchten nach der ULO-Lagerung zu bewirken.

Die Rolle der Pektatlyasen während der Fruchtreife und deren Bedeutung für den Zellwandabbau ist nach Payasi und Sanwal (2003) weitgehend unklar. Die deutlich niedrigeren Expressionswerte von Md-PL bei `Elstar` im Vergleich zu `Pinova` deuten zumindest darauf hin, dass bei `Elstar` Pektatlyasen eine geringere Bedeutung für das Weichwerden der Früchte während der Lagerung spielen. Trotzdem wiesen bei `Elstar` die Früchte nach 9,5 Monaten CA- bzw. ULO-Lagerung geringere Expressionswerte auf als nach der Ernte bzw. Kühlung. Die Ergebnisse bei `Pinova` sind unklar, da an den 1-MCP behandelten Äpfeln eine deutlich höhere Expression von Md-PL gemessen werden konnte als an den unbehandelten Äpfeln. So war zum Beispiel bei `Pinova` nach Kühlung in den Kontrollfrüchten ohne 1-MCP die niedrigste Expression zusammen mit den geringsten Festigkeitswerten gemessen worden, in den 1-MCP behandelten, festeren Äpfeln hingegen die höchsten Expressionswerte.

Trainotti et al. (2003) sowie Goulao et al (2008) machten an Pfirsichen sowie Äpfeln die Beobachtung, dass Pektatlyasen vor allem in der Periode vom Fruchtansatz bis zum Ende der Zellstreckung eine Bedeutung zu haben scheinen. Nach der Ernte stellten sie dagegen beide eine Abnahme der Expression PL kodierender Gene fest. Die reiferverzögernde Lagerung unter ULO-Bedingungen hat in der vorliegenden Arbeit bei `Pinova` womöglich den Rückgang der Expression von Md-PL gegenüber dem Kühlungslager verzögert. Eine verzögerte Reife nach 1-MCP Anwendung könnte ebenfalls erklären, warum in diesen Varianten

deutlich höhere Expressionslevel von Md-PL gemessen wurden als in den Kontrollfrüchten (siehe Kapitel 5.3).

Genexpression sowie Enzymaktivität der β -Galactosidase beider Sorten waren deutlich von der Lagerung abhängig. So wurden bei `Elstar` wie auch bei `Pinova` bei Lagerende deutlich höhere β -Galactosidase-Aktivitäten gemessen als zur Ernte, wobei die ULO-Lagerung gegenüber dem normalen Kühllager eine signifikante Inhibierung der Enzymaktivität bewirkte. Diese Beobachtungen korrelierten mit den fortgeschrittenen Reifemerkmale: geringere Fruchtfleischfestigkeit, erhöhte Respiration und Ethylenproduktion der Äpfel sowie höhere Anteile an gelösten Pektinen in den Zellwandfraktionen.

Die Ergebnisse weisen, darauf hin, dass die Lagerung unter ULO-Bedingungen durch Hemmung der β -Galactosidase-Aktivität zu einer reduzierten Abspaltung der Galactan-Seitenketten im Pektinmolekül und somit zu einer verzögerten Solubilisierung des Pektine geführt hat. Zudem wiesen die Äpfel aus dem Kühllager geringere Gehalte an kovalent gebundenen, Na_2CO_3 -löslichen Pektinen auf, was ebenfalls die Hypothese einer stärkeren Solubilisierung der Pektine durch die Aktivität verschiedener zellwandabbauender Enzyme unterstreicht. Die Korrelation der Enzymaktivität und der CO_2 - sowie Ethylenbildung der Äpfel legt nahe, dass beide reifebestimmenden Prozesse eine zentrale Rolle für die Regelung der Enzymaktivität spielen.

Die gemessene Genexpression von Md- β GS entsprach bei `Pinova` ebenfalls dem Abbau der Fruchtfleischfestigkeit sowie der Aktivität des Enzyms: Im Anschluss an die Ernte wurde die niedrigste Expression gemessen, während der Lagerung nahm diese deutlich zu, wobei ULO-Bedingungen gegenüber dem normalen Kühllager eine deutliche Inhibierung bewirkten. Anders als bei `Pinova` wurde an `Elstar` bereits zur Ernte die höchste Genexpression gemessen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Goulao et al. (2008), der an `Gala` Äpfeln bereits zur Ernte sehr hohe Expressionswerte von pABG1, einem für die β -Galactosidase kodierenden Gen, messen konnte. Bei der Bewertung der Ergebnisse bezüglich Genexpression und Enzymaktivität in der vorliegenden Arbeit gilt es zu beachten, dass die Bestimmung der Enzymaktivität unmittelbar zur Ernte erfolgte, wogegen die Bestimmung der Genexpression erst nach 10-tägigem Shelf-life bei 20°C im Anschluss an die Ernte

durchgeführt wurde. Bei Lagerende erfolgten die Messungen von Genexpression und Enzymaktivität zum gleichen Analysenzeitpunkt, allerdings bereits nach 7 Tagen Shelf-life. Die deutlich höhere Genexpression der β -Galactosidase bei `Elstar` zur Ernte könnte bedeuten, dass bei dieser Sorte im Vergleich zu `Pinova` die Abspaltung von neutralen Zuckern aus dem Pektinmolekül mittels β -Galactosidasen früher einsetzt als bei `Pinova`. Wären die Messungen der Enzymaktivität zur Ernte wie die der Genexpression ebenfalls erst nach dem Shelf-life durchgeführt worden, wäre auch hier vermutlich eine deutlich höhere Enzymaktivität, entsprechend der Genexpression, gemessen worden. Warum bei `Elstar` nach Kühlung eine geringere Expression von Md- β GS trotz höherer Enzymaktivität gemessen wurde als nach der ULO-Lagerung ist unklar. Es wäre denkbar, dass die Aktivität der β -Galactosidase neben Md- β GS durch weitere Gene kodiert wird und diese nach dem Kühlung ein höheres Expressionslevel aufweisen.

Die Genexpression der Arabinofuranosidase (Md-AFase) wurde in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant durch die Lagermethode beeinflusst. Jedoch konnte bei beiden Sorten tendenziell ein Anstieg der Aktivität in den Kühlungvarianten beobachtet werden, wogegen sich die Genexpression nach ULO-Lagerung kaum von den Werten bei Lagerbeginn unterschied. Es wäre möglich, dass Arabinofuranosidasen bei beiden Sorten ähnlich der β -Galactosidasen durch die Hydrolyse neutraler Zucker (Arabinofuranosyl) aus dem Pektinmolekül Einfluss auf die Adhäsion der Polysaccharide untereinander und auf die Verbindung zwischen den Zellen haben. Da die gemessenen Expressionslevel der Arabinofuranosidase deutlich niedriger waren als die der β -Galactosidase ist jedoch zu vermuten, dass die Wirkung der Lagermethoden auf die β -Galactosidase eine größere Rolle für den Festigkeitsverlust der Früchte spielt.

Die Lagerung unter CA bzw. ULO-Bedingungen führte bei beiden Sorten zu einer Inhibierung der Pektinmethylesterase-Aktivität, wobei die Unterschiede zwischen den Lagermethoden bei `Pinova` stärker ausgeprägt waren als bei `Elstar`. Es wäre dementsprechend zu erwarten, dass die Früchte nach CA- bzw. ULO-Lagerung aufgrund der geringeren Demethylierung durch Pektinmethylesterasen einen höheren Methylierungsgrad der Pektine aufweisen als nach dem Kühlung, was die Bildung von Ca^{2+} -Brücken sowie die Hydrolyse

der Pektine durch Polygalacturonasen, falls vorhanden, erschweren könnte (Brummel und Harpster, 2001). In den Zellwandfraktionierungen zeigten die Früchte aus dem CA-Lager jedoch nach der Lagerung deutlich höhere Gehalte an ionisch gebundenen Pektinen als die Kühllagervarianten. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass bereits gebildete ionische Bindungen unter CA-Bedingungen länger stabil bleiben, unter Kühllagerbedingungen hingegen durch die höhere Aktivität verschiedener zellwandabbauender Enzyme und eine daraus resultierende verstärkte Solubilisierung der Pektinmoleküle die Stabilität der mittels Ca^{2+} -Brückenbindungen gebildeten "Egg-box"-Strukturen beeinträchtigt wird. Zum anderen berichten Massiot et al. (1996) sowie Billy et al. (2008) von einer Zunahme des Methylierungsgrades während der Lagerung durch die Neusynthese hoch-methylveresterter Pektine, wobei dies nicht einen höheren Methylierungsgrad in den CA-Varianten gegenüber den Kühllager-Varianten erklären würde. Neben den Messungen der PME-Aktivität in den verschiedenen Versuchen erfolgte in den Untersuchungen mit Calciuminfiltrationen an `Elstar` zudem eine Analyse der Genexpression von Pektinmethylesterase (Md-PME) im Anschluss an die Shelf-life-Phase nach 4,5 Monaten Kühl- bzw. CA-Lagerung. Dabei zeigte die CA-Variante ein höheres Expressionslevel von Md-PME als die Kühllagervariante. Dies widerspricht zunächst den Beobachtungen einer inhibierenden Wirkung von ULO-Bedingungen auf die Enzymaktivität der Pektinmethylesterase. Tucker et al. (1982) konnten jedoch an der Tomatensorte `Ailsa Craig` zwei verschiedene Isoenzyme, PME1 und PME2, identifizieren und beobachten, dass PME1 im Zuge der Fruchtreife leicht abnahm, wogegen bei PME2 ein starker Anstieg der Aktivität zu beobachten war. Auch Goulao (2007) konnte an `Gala` Äpfeln eine Abnahme der PME-Aktivität nach der Ernte feststellen. Eine mögliche Ursache für die höhere PME-Genexpression in den CA-gelagerten Äpfeln könnte im Vorhandensein verschiedener PME-Isoenzyme bei `Elstar` liegen, wobei die Messungen der Enzymaktivität evtl. den Anstieg eines Isoenzym repräsentieren, die Abnahme der Genexpression eines weiteren Isoenzym jedoch durch die Lagerung unter CA-Bedingungen verzögert wurde und dementsprechend ein höheres Expressionslevel in der CA-Variante gemessen werden konnte. Eine weitere mögliche Ursache wäre, dass die Infiltration mit Sorbit in Kombination mit anschließender

Lagerung bei niedrigen O₂- bzw. erhöhten CO₂-Konzentrationen eine Art Stressreaktion stimulierenden Effekt auf die Expression von Md-PME bewirkte.

Percy et al. (1996) sowie Vincken et al. (1998) konnten während der Lagerung von `Braeburn` sowie `Jonagold` Äpfeln nach der Ernte eine Abnahme der Enzymaktivität der Xyloglucan-Endotransglycosylase feststellen. Vergleichbar konnten Goulao et al. (2008) an Gala Äpfeln nach der Ernte eine Abnahme von Md-XTH10 messen. Die Abnahme der Genexpression von Md-XTH10 in der vorliegenden Arbeit entspricht diesen Beobachtungen. Im Gegensatz zu Md-XTH10 nahm jedoch die Genexpression von Md-XTH2 bei beiden Sorten während der Lagerung zu. Betrachtet man die Ergebnisse, so scheinen geringe Expressionswerte von Md-XTH10 mit niedrigen Festigkeitswerten zu korrelieren, wie am Beispiel `Elstar` nach der Lagerung deutlich wurde. Auch bei `Pinova` spiegelt die Expression von Md-XTH10 in etwa die Festigkeitsverhältnisse wieder. Während der ULO-Lagerung mit anschließendem Shelf-life erfolgte im Vergleich zur Ernte weder eine signifikante Veränderung der Fruchtfleischfestigkeit, noch der Genexpression. In der Kühllagervariante hingegen nahmen während dieser Zeit beide Parameter deutlich ab.

Die gemessenen Expressionswerte für Expansin entsprachen den beschriebenen Ergebnissen zu Md-XTH10 und spiegelten somit ebenfalls die Festigkeitsverhältnisse wieder. Zur Ernte waren bei `Elstar`, der Sorte mit intensiverem Festigkeitsverlust, deutlich höhere Expressionswerte zu messen als bei `Pinova`. Anschließend nahmen diese bei beiden Lagervarianten entsprechend dem Festigkeitsverlust ab.

In wie weit die inhibierende Wirkung der ULO-Bedingungen Einfluss auf Veränderungen der Hemizellulosestrukturen während der Lagerung bei beiden Sorten hatte, konnte nicht geklärt werden, da diesbezüglich keine Untersuchungen durchgeführt wurden. Es wäre jedoch möglich, dass eine inhibierte Aktivität von Xyloglucan-Endotransglycosylase sowie Expansin einen hemmenden Effekt auf die Lockerung des Zellulose-Hemizellulose-Netzwerkes, dadurch einen indirekten, evtl. Substrat-limitierenden Effekt auf die Aktivität weiterer Enzyme und somit eine hemmende Wirkung auf die Solubilisierung der Pektine in der Zellwand hatte. Die gemessenen hohen Expressionswerte zur Ernte sowie die anschließende Abnahme während der Lagerung legen nahe, dass die Aktivität von

Xyloglucan-Endotransglycosylase sowie Expansin vor allem zu Beginn des Weichwerdens eine größere Rolle spielen könnte. Dass Expansine Einfluss auf die Substratverfügbarkeit anderer Enzyme haben können, konnten Brummel et al. (1999b) an transgenen Tomaten nachweisen, indem eine Unterdrückung der Akkumulation des Exp1 Proteins nicht nur zu festeren Früchten gegenüber dem Wildtyp führte, sondern auch eine Inhibierung der Depolymerisation von Pektinen während späterer Reifestadien zur Folge hatte.

Im Gegensatz zur in dieser Arbeit gemessenen Abnahme der Expression von Md-Exp2 konnten Wakasa et al. (2003) an `Golden Delicious` während der Reife zusammen mit dem klimakterischen Ethylenanstieg eine Zunahme der Expression eines weiteren Expansin kodierenden Gens, Md-Exp3, beobachten. Goulao et al. (2008) hingegen stellten an `Gala` Äpfeln maximale Expressionswerte von Ms-Exp3 zur Ernte und anschließend eine Abnahme, entsprechend den vorliegenden Ergebnissen zu Md-Exp2 an `Elstar` und `Pinova`, fest. Dies zeigt, dass zum einen bezüglich der Genexpression deutliche Sortenunterschiede bestehen können, zum anderen, dass die Expression verschiedener, für das gleiche Enzym kodierender Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fruchtreife deutlich variieren kann. Um genauere Aussagen dazu machen zu können wäre es jedoch notwendig, parallel zur Analyse der Genexpression Messungen der Enzymaktivitäten durchzuführen.

Die Ergebnisse aus den Zellwandfraktionierungen zeigen, dass die Lagermethode deutlichen Einfluss auf den Abbau der Zellwände hatte. Die Abnahme an extrahierbarem Zellwandmaterial bei beiden Sorten während der Lagerung spiegelt den Abbau der Polysaccharidstrukturen in der Zellwand und deren Übergang in die gelöste Form wieder. Entsprechend konnten Siddiqui et al. (1996) an `Golden Delicious` Äpfeln eine Abnahme an extrahierbarem Zellwandmaterial während sechsmonatiger Lagerung feststellen, wobei, vergleichbar zu den vorliegenden Ergebnissen, diesbezüglich kein Unterschied zwischen Kühl-, CA- oder ULO-Lagerung bestand. Wie von zahlreichen Autoren beschrieben (z.B. Yoshioka et al., 1992; Harpster et al., 2002) spielt beim Apfel während des Weichwerdens weniger eine Depolymerisation der Pektine, also ein Abbau der Hauptgerüststrukturen, sondern viel mehr eine zunehmende Solubilisierung der Pektinmoleküle eine

entscheidende Rolle. Dementsprechend zeigte sich bei beiden Sorten während der Lagerung eine Zunahme an gelösten, vor allem PAW- aber teilweise auch H₂O-löslichen Pektinen.

Untersuchungen zum vergleichenden Einfluss von Kühl- und CA-Lagerung erfolgten nur bei der Sorte `Elstar`. Dabei zeigte sich ein inhibierender Effekt der CA-Lagerung auf die Solubilisierung der Pektine und dementsprechend niedrigere Gehalte an gelösten Pektinen in der Zellwandfraktion. Entsprechend den Ergebnissen zu Genexpression und Aktivität verschiedener Enzyme ist davon auszugehen, dass die gemessene Solubilisierung der Pektine während der Lagerung vor allem auf den Abbau neutraler Zucker an den Seitenketten der Rhamnogalacturonanabschnitte im Pektinmolekül mittels der Aktivität von Glycosidasen und dabei besonders der β -Galactosidasen zurückzuführen ist. Dieser Zerfall der Pektinmatrix führt nach Redgwell et al. (1992) offenbar zum Auflösen der pektinreichen Mittellamelle, somit zu einer Schwächung der Adhäsion benachbarter Zellen und letztlich zu Texturveränderungen der Frucht. Es wäre zudem denkbar, dass Hemizellulasen, wie Xyloglucan-Endotransglycosylasen sowie Expansin, durch Lockerung der Zellulose-Hemizellulose-Strukturen, evtl. über eine Verbesserung der Substrat-Verfügbarkeit anderer Enzyme, den Prozess der Solubilisierung positiv beeinflussen. Die inhibierende Wirkung der Lagerung bei niedrigen O₂- sowie erhöhten CO₂-Konzentrationen auf die Aktivität der entsprechenden Enzyme hat somit vermutlich zur verzögerten Solubilisierung der Pektine in der Zellwand geführt. Wie bereits beschrieben war in den Früchten nach CA-Lagerung ebenfalls ein signifikant höherer Gehalt an CDTA-löslichen, ionisch gebundenen Pektinen messbar als nach Kühlung. CDTA-lösliche Pektine stammen nach Selvendran (1985) vor allem aus der Mittellamelle. Paull et al. (1999) konnten während der Reife von Papayafrüchten eine Zunahme an CDTA-löslichen Polymeren feststellen, wobei die zunehmende Extrahierbarkeit mit dem Anstieg an H₂O-löslichen Pektinen korrelierte. Entsprechend dazu sind die geringeren Gehalte an ionisch gebundenen, CDTA-löslichen Pektinen nach Kühlung vermutlich auf eine im Vergleich zur CA-Lager-Variante intensivere Solubilisierung der Pektine zurückzuführen.

Der Gehalt an kovalent gebundenen, Na₂CO₃-löslichen Pektinen war bei `Elstar`-Äpfeln nach CA-lagerung ebenfalls signifikant höher als nach dem Kühlungslager, was Ergebnissen von

Siddiqui et al. (1996) entspricht. Demnach war während 4 sowie 6 Monaten Lagerung der Verlust an kovalent gebundenen Pektinen im Kühllager deutlich stärker als im CA- bzw. ULO-Lager. Im Gegensatz dazu nahm in den vorliegenden Versuchen während der Lagerung bei 10°C der Gehalt an kovalent gebundenen Pektinen bei `Elstar` und `Pinova` zu. Hätte die Aktivität von Pektinasen, wie Polygalacturonasen oder Pectatlyasen zu einer messbaren Depolymerisation der Pektinmoleküle während der Lagerung geführt, so wäre anstatt des Anstiegs eine Abnahme an kovalent gebundenen Pektinen zu erwarten gewesen. Es wäre möglich, dass z.B. die Aktivität von Xyloglucan-Endotransglycosylasen oder Expanin über die Lockerung der Verbindungen zwischen Zellulosen und Hemizellulosen zu einer zunehmenden Extrahierbarkeit der kovalent gebundenen Pektine geführt haben, woraus sich der gemessene Anstieg erklären lässt. Anhand von Gelfiltrationen konnten Siddiqui et al. (1996) in ihren Untersuchungen mit `Golden Delicious` feststellen, dass sich die Molekülgröße der Polyuronide während der Lagerung in den solubilisierten, den ionisch gebundenen sowie den kovalent gebundenen Pektinfraktionen kaum änderte, woraus die Autoren schlossen, dass die Solubilisierung der Pektine mehr auf die enzymatische Spaltung der Verbindungen zwischen den Pektinen als auf eine Depolymerisation der Pektinketten selbst zurückzuführen ist. Wenn man folglich davon ausgeht, dass der Abbau des Hauptgerüsts der Pektinketten keine oder eine nur geringe Rolle spielt, stellt sich die Frage, welche Bedeutung die in der vorliegenden Arbeit gemessene Genexpression der Pektinasen, vor allem der Polygalacturonasen, für das Weichwerden der Äpfel hat. Nachweise über eine messbare Genexpression (Wu et al., 1993; Wakasa et al., 2006; Goulao et al., 2008; Wei et al., 2010) sowie Enzymaktivität (Abeles und Biles, 1991; Wu et al. 1993; Goulao et al., 2007; Wei et al., 2010) der Polygalacturonasen an Äpfeln lassen sich in der Literatur finden. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Genexpression von Md-PG2 deutet darauf hin, dass Polygalacturonasen eine Rolle während der Fruchtreife von Äpfeln spielen. Welche Prozesse durch die Aktivität des Enzyms dabei katalysiert werden und ob diese tatsächlich von Bedeutung für das Weichwerden der Früchte sind, kann anhand der durchgeführten Analysen nicht eindeutig festgestellt werden.

5.3 Einfluss von Ethylen und 1-MCP auf Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau

Ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Rolle von Ethylen für die Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit und für die Regulierung des Zellwandabbaus bzw. der daran beteiligten Enzyme. Neben der stimulierenden Wirkung durch die Applikation von exogenem Ethylen wurde eine Reihe von Untersuchungen zur hemmenden Wirkung des Ethyleninhibitors 1-MCP durchgeführt um diese Fragen näher zu untersuchen.

1-MCP wirkte in der vorliegenden Arbeit bei beiden Sorten inhibierend auf den Abbau der Fruchtfleischfestigkeit, auf die Respiration, die Ethylenbildung, auf die Genexpression sowie Enzymaktivität der meisten untersuchten zellwandabbauenden Enzyme sowie auf den Abbau der Pektinstrukturen in der Zellwand. Da der Effekt von 1-MCP auf einer Blockierung der Ethylenwirkung an den Rezeptoren beruht, zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass die genannten Prozesse und Veränderungen während der Fruchtreife, zumindest teilweise, durch Ethylen reguliert werden.

Die Wirkung von 1-MCP auf die Fruchtfleischfestigkeit war bei `Elstar` deutlich stärker ausgeprägt als bei `Pinova`, da `Pinova` selbst in der unbehandelten Kontrolle im Vergleich zu `Elstar` einen sehr guten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit aufwies. So brachte zum Beispiel 1-MCP bei `Pinova` in Kombination mit CA- bzw. ULO-Lagerung keinen steigernden Effekt auf die Festigkeit. Deutlich wurden die Unterschiede zwischen 1-MCP behandelten und unbehandelten Früchten vor allem während der Shelf-life-Phasen bei 20°C sowie während der Lagerung bei 10°C, also unter Bedingungen, die eine beschleunigte Fruchtreife verursachen. In Kombination mit der CaCl₂-Infiltration brachte bei kürzerer Lagerdauer 1-MCP keinen zusätzlichen Effekt zur bereits festigkeitserhaltenden, positiven Wirkung von CaCl₂; nach längerer Lagerung jedoch zeigte eine Kombination beider Maßnahmen das beste Ergebniss auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit.

Ein positiver Effekt von 1-MCP auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit während der Lagerung sowie während des Shelf-lifes wurde in den letzten Jahren von zahlreichen Autoren beschrieben (z.B. Fan et al. 1999; Baritelle et al. 2001; Younes und Streif, 2005, Streif et al.,

2010). Auch die Inhibierende Wirkung von 1-MCP auf Ethylen- sowie CO₂-Produktion, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, konnte in vielen Untersuchungen festgestellt werden (z.B. Fan et al., 1999; Fan und Mattheis, 1999; Rupashinghe et al. 2000; Watkins et al., 2000; Jiang und Joyce, 2002). Eine sortenabhängige Wirkung von 1-MCP, wie bei `Elstar` und `Pinova`, wurde z.B. von Bai et al. (2005) beschrieben. Dabei zeigte die Applikation von 1-MCP bei `Gala`, `Golden Delicious` sowie `Granny Smith` eine deutlich intensivere Wirkung auf die Fruchtfleischfestigkeit als bei der festfleischigen Sorte `Fuji`.

In den Versuchen mit `Elstar` und `Pinova` wurde durch 1-MCP vor allem die Ethylenproduktion nahezu vollständig reduziert. Dieser Effekt war hauptsächlich nach der Ernte sowie nach Kühlagerung zu sehen, da sowohl CA- als auch ULO-Lagerung alleine bereits eine starke Hemmung der Ethylenbildung bewirkten. Größere Festigkeitsunterschiede, wie sie normalerweise bei einem Vergleich von Kühl-, CA- sowie ULO-Lager zu beobachten sind, wurden durch die Anwendung von 1-MCP nahezu ausgeglichen. Dies weist deutlich darauf hin, dass der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel weitestgehend durch Ethylen reguliert wird. Auch bezüglich der Atmungsintensität der Äpfel während des Shelf-lifes gab es bei 1-MCP behandelten Früchten kaum Unterschiede zwischen Kühl-, CA- oder ULO-Lager. Im Gegensatz zur Ethylenproduktion war jedoch bei den 1-MCP behandelten Äpfeln bei beiden Sorten noch eine deutliche CO₂-Produktion zu messen, wenn auch diese, vor allem bei Äpfeln aus dem Kühllager, gegenüber den unbehandelten Früchten deutlich niedriger war.

Nach Binder und Bleeker (2003) hemmt 1-MCP die Ethylenwirkung indem es sich an die Ethylenrezeptoren bindet, wodurch die Serin-Threonin-Kinase (CTR1) im aktiven, also die weiteren Reifevorgänge hemmenden Zustand bleibt. Die Expression reifebezogener Gene, welche zum Beispiel für die Synthese bestimmter Zellwand abbauender Enzyme kodieren, wird dadurch inhibiert. Tatsuki und Endo (2006) untersuchten an `Fuji` und `Orin` Äpfeln den Einfluss von 1-MCP auf die Expression der Ethylenrezeptor-Gene Md-ETR1, Md-ERS1 sowie Md-ERS2. Bei beiden Sorten führte 1-MCP zu einer deutlichen Inhibierung von Md-ERS1 sowie Md-ERS2, Md-ETR1 hingegen wurde nur geringfügig gehemmt. Die Autoren schlossen daraus, dass eine mögliche Ursache für die intensive Wirkung von 1-MCP an Äpfeln darin

liegt, das ETR1 bei Anwesenheit von 1-MCP in aktivem, also inhibitorischen Zustand gehalten wird. Zudem konnten Tatsuki und Endo (2006) an `Fuji`, der Sorte mit stabileren Festigkeitseigenschaften bzw. längerem Shelf-life, eine intensivere Akkumulation von Md-ERS1 und Md-ERS2 mRNA messen. Unter Berücksichtigung eines negativ regulierten Ethylenwirkungsmechanismus würde dies Unterschiede in der sortenspezifischen Sensitivität für Ethylen bzw. 1-MCP, wie an `Elstar` und `Pinova` beobachtet, erklären. Cin et al. (2006) konnten an `Golden Delicious` nach 1-MCP Behandlung neben einer Inhibierung der Ethylenbiosynthese sowie der Genexpression der entsprechenden Enzyme ACC-Synthase (Md-ACS1) und ACC-Oxidase (Md-ACO) eine down-Regulierung von Md-ETR1 sowie Md-ERS1 messen, wogegen Md-CTR1 durch 1-MCP kaum beeinflusst wurde.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Wirkung von 1-MCP an Äpfeln scheinbar darauf zurückzuführen ist, dass einzelne Rezeptoren durch die Bindung von 1-MCP in aktivem, inhibitorischem Zustand gehalten werden, anstatt durch Ethylen inaktiviert zu werden. Sortenunterschiede sind dabei womöglich auf unterschiedliche Expressionslevel sowohl der an der Ethylenbiosynthese beteiligten Enzyme als auch der Ethylenrezeptoren zurückzuführen. Warum 1-MCP im Gegensatz zu Ethylen keine Inaktivierung der Rezeptoren bewirkt, ist bislang noch unklar (Prange und De Long, 2003). Rodriguez et al. (1999) konnten an Arabidopsis feststellen, dass Kupfer eine wichtige Rolle als Kofaktor für die Bindung von Ethylen an den Rezeptor ETR1 darstellt. Nach Binder und Bleeker (2003) wäre es möglich, dass sich 1-MCP an den "Kupfer-Kofaktor" des Rezeptors bindet und dadurch, eventuell räumlich bedingt, die Bindung nicht ausreicht, um den Rezeptor in einen inaktiven Zustand zu versetzen.

Anhand von Ethylenapplikationen sollte in der vorliegenden Arbeit unter anderem untersucht werden, ob es sich bei der Wirkung von 1-MCP um einen reversiblen Vorgang handelt. Erfahrungen in den letzten Jahren zeigten, dass die reifeinhibierende Wirkung von 1-MCP nach längerer Lagerdauer je nach Lagerbedingungen früher oder später nachlassen kann, was zu einem fortschreitenden Festigkeitsabbau in Verbindung mit weiteren Reifeprozessen führt. Als mögliche Ursachen dafür werden eine Neusynthese von

Ethylenrezeptoren oder eine Lockerung der Rezeptor-1-MCP-Bindung diskutiert (Huber et al. 2003).

Ein deutlicher Einfluss der Ethylenapplikationen auf die Fruchtfleischfestigkeit der Früchte konnte in keinem der Versuche, weder an `Elstar` noch an `Golden Delicious` festgestellt werden. In den Untersuchungen mit `Elstar` war zumindest tendenziell in der Variante mit 2-3 maliger Ethylenbehandlung pro Woche während der Lagerung ein, wenn auch geringer, fördernder Effekt auf die Ethylenproduktion während der anschließenden Shelf-life Phase festzustellen. Mögliche Ursachen für diese geringe Wirkung könnten zum einen in der Ethylensynthese-hemmenden Wirkung der niedrigen O₂ bzw. erhöhten CO₂-Konzentrationen im Lager zu finden sein, welche, wie andere Versuche in der vorliegenden Arbeit zeigten, auch während dem Shelf-life im Anschluss an die Lagerung eine nahezu vollständige Inhibierung der Ethylenproduktion bewirken können. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass der Messzeitraum bzw. die Shelf-life Phase zu kurz war, um eine signifikante Wirkung der Ethylenbehandlung zu beobachten. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Johnston et al. (2002b), in denen bei `Granny Smith` die Behandlung mit Ethylen zwar zur Induzierung der Ethylensynthese und zum beschleunigten Festigkeitsverlust führte, dieser Effekt jedoch erst 15 bis 20 Tage verzögert nach der entsprechenden Applikation auftrat. Dies würde auch erklären, warum nach dauerhafter Ethylenapplikation während der Lagerung zumindest eine geringe fördernde Wirkung auf die Ethylenproduktion beobachtet werden konnte, wogegen eine Applikation erst zu Beginn des Shelf-lifes keinen Effekt zeigte. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die Sorte `Elstar` nur eine geringe Empfindlichkeit auf extern appliziertes Ethylen aufweist.

Aus den genannten Gründen wurden im dritten Versuchsjahr erneut Untersuchungen zur Wirkung von Ethylenapplikationen durchgeführt, jedoch mit der Sorte `Golden Delicious` sowie unmittelbar nach der Ernte ohne vorherige Lagerung. Während die 1-MCP-Applikation zu Beginn des Shelf-lifes bereits eine nahezu vollständige Inhibierung der Ethylensynthese sowie eine signifikant niedrigere, abnehmende Respiration der Äpfel bewirkte, nahmen in den unbehandelten sowie den C₂H₄-behandelten Äpfeln Atmung und Ethylenproduktion in gleicher Weise, ohne erkennbare Unterschiede, zu. Nach erneuter Ethylenapplikation

3 Tage nach Shelf-life-Beginn zeigten die Ethylen-behandelten Äpfel eine nur leicht erhöhte Respiration. Eine deutliche Inhibierung von Atmung und Ethylenproduktion bewirkte jedoch die Applikation von 1-MCP nach 3 Tagen Shelf-life, sowohl bei den Früchten, die anfangs mit Ethylen behandelt worden waren als auch bei denen, die bis zu diesem Zeitpunkt unbehandelt blieben. Diese Beobachtung könnte zum einen darauf hinweisen, dass 1-MCP über eine kompetitive Wirkung gegenüber Ethylen zu einer Art "Verdrängung" der Ethylenmoleküle an den Rezeptoren führt. Zum anderen wäre denkbar, dass 1-MCP sich an bis zu diesem Zeitpunkt unbesetzte oder neu synthetisierte Rezeptoren bindet, was ebenfalls zu einer Inhibierung der Reifeprozesse führt. Es zeigte sich zudem deutlich, dass eine frühe Applikation von 1-MCP eine intensivere Hemmung der Fruchtreife bewirkte als eine spätere Anwendung. Nach 9 Tagen Shelf-life erfolgte an den 1-MCP behandelten Früchten eine erneute, tägliche Applikation von Ethylen. Die Ethylenproduktion der anfangs mit 1-MCP behandelten Äpfel reagierte nicht auf die erneute Applikation von Ethylen. Die am Tag 3 mit 1-MCP behandelten Äpfel jedoch zeigten, unabhängig davon ob zu Beginn Ethylen appliziert wurde, einen allmählichen Anstieg der Ethylenproduktion. Dies würde auf eine deutliche Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Applikationstermin hinweisen. Werden die Früchte bereits in sehr frühem Stadium mit 1-MCP behandelt, führt dies vermutlich zur inhibitorischen Aktivierung eines Großteils der Rezeptoren. Es wäre möglich, dass eine spätere Neusynthese von Ethylenrezeptoren ebenfalls Ethylen-abhängig erfolgt und somit bei nahezu vollständiger Hemmung der Rezeptoren zu Beginn der Fruchtreife in präklimakterischem Stadium die Neusynthese von Rezeptoren inhibiert wird. Dies könnte erklären, warum zu einem späteren Zeitpunkt mit 1-MCP behandelte Früchte bezüglich ihrer Ethylenproduktion auf die täglichen Ethylengaben reagierten.

Zu ähnlichen Schlüssen kamen Cin et al. (2006). Ausgehend von der Hypothese, wonach sich 1-MCP an die zum Zeitpunkt der Behandlung vorhandenen Rezeptoren bindet und eine dadurch inhibierte Regeneration der Rezeptoren zum Ausbleiben der Reifeprozesse führt (Blankenship und Dole, 2003), vermuteten Cin et al. (2006), dass ähnliche Prozesse in Äpfeln, in denen die Expression von Md-ERS1 inhibiert wird, ablaufen. Basierend auf der Annahme, dass das Level an Rezeptor mRNA die Menge an synthetisierten Proteinen widerspiegelt, wie von Klee et al. (2003) an Tomaten vorgeschlagen, kamen Cin et al. (2006) zu der

Hypothese, dass die Bindung von 1-MCP an die Ethylenrezeptoren in präklimakterischen Äpfeln die autokatalytische Ethylensynthese blockiert und dadurch die Ethylen-abhängige Synthese neuer Rezeptoren unterbunden wird.

Die Reaktion der Früchte bezüglich der Respiration unterschied sich von der Ethylenproduktion. Äpfel, die zu Tag 0 und Tag 3 des Shelf-lifes eine Kombination von 1-MCP sowie Ethylen erhalten hatten, reagierten auf die tägliche Ethylenapplikation ab Tag 9 mit einem Anstieg der CO₂-Produktion, wogegen Äpfel, die zuvor nur mit 1-MCP behandelt wurden, ohne vorherige oder nachherige Ethylenapplikation, darauf keine Reaktion zeigten.

Eine inhibitorische Wirkung von 1-MCP auf die Fruchtatmung wurde, wie bereits erwähnt, von zahlreichen Autoren beschrieben, jedoch finden sich dabei kaum Aussagen darüber, auf welchen physiologischen Prozessen dieser Zusammenhang zwischen Ethylen und der Fruchtatmung beruht. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hindeuten, dass die Rolle von Ethylen für die Respiration der Früchte vermutlich vor allem auf eine ethylenabhängige Synthese zahlreicher an der Fruchtatmung beteiligter Enzyme zurückzuführen ist.

Die Rolle von Ethylen für die Synthese von Proteinen erklärt vermutlich auch den inhibierenden Effekt von 1-MCP auf die Genexpression eines Großteils der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, zellwandabbauenden Enzyme. An `Elstar` bewirkte 1-MCP eine deutliche Inhibierung der Genexpression von Polygalacturonase (Md-PG2), Pectatlyase (Md-PL), β -Galactosidase (Md- β GL), Arabinofuranosidase (Md-AFase), Xyloglucan-Endotransglycosylase (Md-XTH2; Md-XTH10), β -Xylosidase (Md-PME) sowie Expansin (Md-Exp2). Md-XTH10 sowie Md-AFase wurden bei `Pinova` durch 1-MCP nicht beeinflusst. Die Expression von Md-PL war in den 1-MCP behandelten Äpfeln deutlich höher als in den Kontrollfrüchten. Die Genexpression aller anderen Enzyme wurde bei `Pinova` durch 1-MCP ebenfalls deutlich inhibiert. Entsprechend der Genexpression wurde auch die Enzymaktivität von β -Galactosidase und Pektinmethylesterase bei beiden Sorten durch 1-MCP deutlich gehemmt.

Die Anreicherung von PG mRNA wird nach Sitrit und Bennett (1998) durch Ethylen reguliert und bereits geringe Mengen an Ethylen reichen für eine Induzierung aus. Untersuchungen

von Wakasa et al. (2006), in denen Sorten mit sehr gutem Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit, unabhängig von der jeweiligen Ethylenproduktionsrate, eine sehr schwache Expression von Md-PG1 aufwiesen, deuten darauf hin, dass für die Genexpression der Polygalacturonase mehr die Empfindlichkeit gegenüber Ethylen als die absolute Menge an produziertem Ethylen von Bedeutung ist. Eine Inhibierung der PG-Genexpression verbunden mit einer reduzierten Ethylenbildung konnte an Äpfeln zum Beispiel von Wakasa et al. (2006) sowie Wei et al. (2010) beobachtet werden. In den Untersuchungen von Wei et al. (2010) war die Wirkung von 1-MCP auf Genexpression und Enzymaktivität, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, stark sortenabhängig. Während 1-MCP an `Golden Delicious` eine deutliche Inhibierung von Genexpression und Enzymaktivität der Polygalacturonase bewirkte, waren die Unterschiede bei `Fuji` wesentlich geringer. 1-MCP zeigte in der vorliegenden Arbeit an beiden Sorten eine nahezu vollständige Inhibierung der Expression von Md-PG2. `Pinova` wies jedoch auch bei den Kontrollvarianten ohne 1-MCP eine deutlich niedrigere Genexpression auf als `Elstar`.

Die Expression des Pectatlyase kodierenden Gens Md-PL war bei `Elstar` ebenfalls durch 1-MCP gehemmt, allerdings waren selbst in der Kontrolle bei `Elstar` im Vergleich zu `Pinova` nur sehr geringe Werte zu messen. Die deutlich höheren Expressionswerte der 1-MCP behandelten `Pinova` Äpfel gegenüber den Kontrollfrüchten lassen sich möglicherweise auf eine verzögerte Abnahme der Genexpression während der Lagerung in den 1-MCP behandelten Früchten erklären.

Ähnlich den Ergebnissen zu Md-PG2 führte 1-MCP an beiden Sorten zu einer deutlichen Inhibierung der Genexpression von β -Galactosidase, Arabinofuranosidase, Xyloglucan-Endtransglycosylase sowie Expansin. Eine höhere Expression in der 1-MCP-Variante, wie zum Beispiel bei `Pinova` nach Kühllagerung und anschließendem Shelf-life, ist vermutlich, ähnlich wie bei der Pectatlyase, auf eine verzögerte Abnahme der Genexpression durch 1-MCP zu erklären. Auch die geringen Unterschiede zwischen 1-MCP behandelten und Kontrollfrüchten bezüglich der Expression von Exp2 (Expansin) nach dem Kühllager sind vermutlich auf eine fortgeschrittene Reife und damit Abnahme der Expression

zurückzuführen, während in der 1-MCP-Variante die Genexpression zu diesem Zeitpunkt vermutlich erst zunahm.

Entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in neuesten Untersuchungen von Wei et al. (2010) ein stark inhibierender Effekt von 1-MCP auf die Genexpression sowie Enzymaktivität von Polygalacturonase, β -Galactosidase, Pektinmethylesterase sowie α -L-Arabinofuranosidase festgestellt werden. Die Behandlung mit Ethephon führte dabei zu einer Stimulierung von Genexpression und Enzymaktivität, was deutlich zeigt, dass die genannten Enzyme, wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, durch Ethylen reguliert werden. Der Effekt von 1-MCP sowie Ethephon war dabei, entsprechend den beobachteten Sortenunterschieden bei `Elstar` und `Pinova`, bei der Sorte `Golden Delicious` stärker ausgeprägt als bei `Fuji`. Eine nahezu vollständige Inhibierung von Md-Exp3 (Expansin) durch 1-MCP konnten Wakasa et al. (2003) an Golden Delicious nachweisen. Die Ergebnisse aus Versuchen von Villareal (2010) an der Erdbeersorte `Toyonoka`, in denen 1-MCP und Etephon keine Wirkung auf die Enzymaktivität der Arabinofuranosidase zeigten, deuten darauf hin, dass die Regulierung der Enzyme bei klimakterischen und nicht klimakterischen Früchten unterschiedlich zu erfolgen scheint. Über den Einfluss von 1-MCP auf die Genexpression bzw. Enzymaktivität von Endoglucanase, β -Xylosidase sowie Xyloglucan-Endotransglycosylase an Äpfeln lassen sich in der Literatur keine Hinweise finden. Ein inhibierender Effekt von 1-MCP auf die Genexpression der Xyloglucan-Endotransglycosylase (Dk-XTH1) konnte jedoch an Kaki-Früchten von Nakatsuka et al. (2011) festgestellt werden. Eine Hemmung der Enzymaktivität der β -Xylosidase durch 1-MCP wurde von Botondi et al. (2003) an Aprikosen der Sorte `Ceccona` gemessen. Li et al. (2011) stellten an Melonen der Sorte `Hami` eine reduzierte ACC-Akkumulation, eine geringere Aktivität der ACC-Synthase sowie ACC-Oxidase sowie eine Inhibierung der Endoglucanase-Aktivität fest. Vergleichbar konnten Ortiz und Lara (2008) an Pfirsichen der Sorte `Tardibelle` eine geringere Zunahme der Endoglucanase-Aktivität während des Shelf-lifes im Vergleich zu unbehandelten Kontrollfrüchten beobachten.

Die beschriebene Wirkung von 1-MCP auf die Genexpression und Enzymaktivität der zellwandabbauenden Enzyme spiegelt sich in den Ergebnissen der Zellwandfraktionierungen

wieder. Bezüglich der Gesamtmenge an extrahierbarem Zellwandmaterial waren zwar in den 1-MCP behandelten Früchten nur tendenziell höhere Gehalte zu messen, jedoch wurden alle anderen Fraktionen deutlich durch die Behandlung mit dem Ethyleninhibitor beeinflusst. Die geringeren Gehalte an PAW- sowie H₂O löslichen Pektinen in den 1-MCP behandelten Äpfeln belegen eine verzögerte bzw. reduzierte Solubilisierung der Pektine, was sich auf die gehemmte Aktivität der beteiligten Enzyme zurückführen lässt. Ähnlich konnten Liu et al. (2005) an 1-MCP behandelten Pfirsichen einen verzögerten Anstieg an gelösten Pektinen feststellen. Jeong und Huber (2004) berichten von einer verzögerten Solubilisierung sowie einem verzögerten Abbau von Polyuroniden zusammen mit geringeren Aktivitäten von Polygalacturonase (PG) und Endoglucanase (EGase) in 1-MCP behandelten Avocado Früchten. Die höheren Gehalte an CDTA-löslichen, ionisch gebundenen Pektinen in den 1-MCP behandelten Früchten entsprechen der reduzierten Solubilisierung der Pektine und einem damit verbesserten Erhalt der Ca²⁺-Brückenbindungen zwischen den Pektinmolekülen. Bezüglich des Gehaltes an kovalent gebundenen, Na₂CO₃-löslichen Pektinen ergaben sich keine klaren Ergebnisse. Nach Lagerung waren in den 1-MCP-Varianten zum Teil höhere Gehalte an kovalent gebundenen Pektinen zu messen, was erwartungsgemäß einem inhibierten Zellwandabbau entsprechen würde. Bedenkt man jedoch, dass der Gehalte an Na₂CO₃-löslichen Pektinen während der Lagerung zunahm und geht man davon aus, dass dies auf eine zunehmende Extrahierbarkeit der Pektine aufgrund einer Lockerung der Zellwände zurückzuführen ist, wäre an den 1-MCP behandelten Früchten entsprechend ein reduzierter Anstieg an Na₂CO₃-löslichen Pektinen während der Lagerung zu erwarten gewesen. Ähnliches konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest während 10-wöchiger Lagerung bei 10°C beobachtet werden. Während sich bei `Pinova` 1-MCP behandelte Früchte und Kontrollfrüchte nicht unterschieden, waren bei `Elstar` nach 10 Wochen in der Kontrolle höhere Gehalte an Na₂CO₃-löslichen Pektinen zu messen als an den 1-MCP behandelten Äpfeln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass Ethylen eine zentrale Rolle für die Regulierung der am Zellwandabbau beteiligten Enzyme spielt und dass die Inhibierung der Ethylensynthese- bzw. -wirkung über eine Hemmung der Genexpression und Aktivität dieser Enzyme den Zellwandabbau und somit den Festigkeitsverlust der Früchte reduzieren

kann. Die Beobachtung, dass trotz zum Teil nahezu vollständiger Inhibierung der Ethylenproduktion dennoch mRNA bzw. Aktivität der entsprechenden Enzyme gemessen werden konnte, weist darauf hin, dass neben Ethylen vermutlich noch andere Faktoren von Bedeutung für die genannten Regulierungsmechanismen sind. Es liegt nahe, dass die Fruchtatmung und damit die Bereitstellung von Energie in Form von ATP eine Voraussetzung für die während des Zellwandabbaus ablaufenden Prozesse darstellt.

5.4 Einfluss von Calcium auf Fruchtfleischfestigkeit, Reife und Zellwandabbau

Anhand von Calciuminfiltrationen sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Ca^{2+} auf das Reifeverhalten, die Genexpression und Enzymaktivität zellwandabbauender Enzyme, den Pektinabbau in der Zellwand und somit letztendlich auf die Fruchtfleischfestigkeit bei der Sorte `Elstar` genauer untersucht werden. Dabei konnte ein deutlich positiver Einfluss der CaCl_2 -Infiltrationen auf die Fruchtfleischfestigkeit der Früchte festgestellt werden, wobei dieser vor allem im Kühllager zu beobachten war. Die Wirkung der Calciuminfiltration entsprach dabei zumindest bei mittlerer Lagerdauer (4,5 Monate) der Wirkung von 1-MCP und inhibierte vollständig das Weichwerden der Früchte während der Lagerung sowie während des Shelf-lifes. Nach längerer Lagerdauer (9 Monate) führte nur die Kombination von Calciuminfiltration und 1-MCP zu einem deutlich verbesserten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit. Im CA-Lager brachte die Calciuminfiltration größtenteils keine bzw. nur geringe Wirkung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Lagerung bei niedrigen O_2 -Werten im Anschluss an die Infiltration, durch Sauerstoffmangel in den Interzellularen, zu einer Störung der physiologischen Prozesse in der Frucht führte. Nach Trentham et al. (2008) können Infiltrationen mit Ca^{2+} -Lösungen auch eine schädliche Wirkung auf die Fruchtphysiologie haben. Hewett und Thompson (1992) beobachteten an Calcium-infiltrierten Apfelfrüchten eine Zunahme der internen CO_2 - sowie eine Abnahme der O_2 -Konzentrationen. Nach Solomos (1987) kann es durch die Füllung der Interzellularen nahe der Lentizellen mit Infiltrationslösung zu einer Beeinträchtigung des Gasaustausches zwischen Zellinnerem und -äußerem kommen. Diese Blockierung des Gasaustausches kann zu O_2 -Mangel sowie CO_2 -Überschuss mit anschließenden physiologischen Schäden an der Frucht führen (Rajapakse et al., 1992). Zwar konnten in der vorliegenden Arbeit an den

Ca-infiltrierten Äpfeln aus dem CA-Lager keine physiologischen Schäden beobachtet werden, jedoch wiesen diese Früchte zum Teil eine höhere Ethylenproduktion auf als die nur mit Mannit infiltrierten Äpfel, was möglicherweise darauf hindeutet, dass die Infiltration mit CaCl_2 in Kombination mit CA-Bedingungen zur einer Art Stressreaktion in den Früchten führte. Zudem war die Genexpression einzelner zellwandabbauender Enzyme, wie zum Beispiel der Polygalacturonase, der Endoglucanase oder der Pectatlyase, in den Ca-infiltrierten Äpfeln nach CA-Lagerung höher als in den Kontrollfrüchten, was die Hypothese einer Stressreaktion unterstützt. Andererseits wäre es jedoch auch möglich, dass die höheren Enzymaktivitäten auf eine im Vergleich zur Kontrolle verzögerte Fruchtalterung zurückzuführen sind. Insgesamt war im CA-Lager auf Grund der bereits inhibierenden Wirkung der Lagerbedingungen der Einfluss der CaCl_2 -Infiltration deutlich geringer als im Kühllager.

Ein direkter, positiver Effekt erhöhter Calciumkonzentrationen auf die Fruchtfleischfestigkeit, wie nach erfolgter CaCl_2 -Infiltration beobachtet, lässt sich unter anderem durch einen direkten Einfluss des Calciums auf die Stabilität der Mittellamelle und einen damit verbesserten Erhalt des Zell-zu-Zell-Kontaktes erklären. Die Bildung von Calciumbrücken an den freien Carboxylgruppen der nicht veresterten Homogalacturonanabschnitte des Pektinmoleküls führt zu einer Vernetzung der Pektine untereinander und dadurch zu einer Festigung der Zellwand, wie von zahlreichen Autoren beschrieben (Grant et al., 1973; Knee und Bartley, 1981; Jarvis, 1984; Stow, 1993). Vor allem in der Mittellamelle führt die Bildung dieser sogenannten Egg-Box-Strukturen zu einer verbesserten Adhäsion der benachbarten Zellen in reifen Früchten (Peña und Carpita, 2004).

Glenn und Poovaiah (1990) konnten an Calcium-infiltrierten Apfelfrüchten nach der Lagerung zeigen, dass an Stellen des "Gewebebruchs" vor allem gebrochene Zellen zu finden waren, wogegen Äpfel, die nicht infiltriert worden waren, an den entsprechenden Stellen eine Separation der Zellverbände im Bereich der Mittellamelle zeigten. Dies beweist, dass Calcium vor allem für die Stärkung der Mittellamelle und somit Festigung der Gewebestabilität eine wichtige Rolle spielt. Nach Knee (1982) und Stow (1993) kann das Weichwerden der Früchte eine Folge des Verlustes an Calcium aus der Mittellamelle bzw.

des Verlustes an Bindungsstellen für Calcium im Pektinmolekül sein. Somit kann der positive Einfluss der Calciuminfiltrationen auf die Festigkeit an `Elstar` in der vorliegenden Arbeit, zumindest teilweise, auf eine Stabilisierung der Mittellamelle mittels Calciumbrücken zurückgeführt werden. Die größere gemessene Aktivität der Pektinmethylesterase sowie die höheren Gehalte an ionisch gebundenen Pektinen nach der Lagerung bei `Pinova` im Vergleich zu `Elstar` weisen darauf hin, dass dieser stabilisierende Effekt auf die Mittellamelle bei `Pinova` evtl. ausgeprägter ist als bei `Elstar`, was, zumindest zum Teil, das stabilere Shelf-life der Sorte begründen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch auch, dass Calcium einen deutlichen Effekt auf die Atmung und Ethylenproduktion sowie auf die Genexpression und Aktivität der am Zellwandabbau beteiligten Enzyme haben kann. Die Ethylenbildung der Äpfel wurde durch die Infiltration mit CaCl_2 deutlich inhibiert, wobei dieser Effekt vor allem bei Äpfeln ohne 1-MCP sowie im Kühllager ausgeprägter war und teilweise dem stark hemmenden Effekt der 1-MCP-Behandlung entsprach. Bei längerer Lagerung (9 Monate) zeigte die Kombination aus Calciuminfiltration und 1-MCP, zumindest nach dem Kühllager, die stärkste reduzierende Wirkung auf die Ethylenproduktion. Wie diese wurde auch die Respiration der Äpfel durch die CaCl_2 -Infiltrationen gehemmt, wenngleich in deutlich geringerem Ausmaß. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Sams und Conway (1984) an `Golden Delicious` Äpfeln. Sie konnten nach Calciuminfiltration eine deutliche Inhibierung der Ethylenproduktion feststellen, sowohl unmittelbar in der Shelf-life Phase nach der Behandlung als auch nach 5 Monaten Lagerung, wobei die Wirkung im Laufe der Lagerung abnahm. Die Respirationsrate der Früchte wurde dabei nicht durch Calcium beeinflusst. Ein inhibierender Effekt von Calcium auf die Respiration sowie Ethylenproduktion von Äpfeln wurde zudem unter anderem von Song und Bangerth (1993) beschrieben. Ortiz et al. (2011) stellten ebenfalls nach Ca-Tauchbehandlungen eine teilweise Reduzierung der Ethylenproduktion bei `Golden Delicious` Äpfeln fest. Glenn et al. (1988) konnten nach Calciuminfiltration im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Fruchtfleischfestigkeit, eine geringere Respiration sowie Ethylenproduktion der Früchte, höhere Ascorbinsäure- sowie Chlorophyllgehalte sowie eine geringere Permeabilität des Fruchtgewebes nachweisen. Sie schlossen daraus, dass erhöhte Calciumgehalte zu einer Verlangsamung der Fruchtalterung führen.

Legge et al. (1982) sowie Lara und Vendrell (1998) führen als Ursache für die inhibierende Wirkung von Calcium auf die Ethylenproduktion dessen Rolle für den Erhalt der Zellmembran an, wodurch es zu einer verzögerten ACC-Oxidase katalysierten Umwandlung von ACC zu Ethylen kommt. Entsprechend fanden Paliath et al. (1984), dass Ca^{2+} reduzierend auf die mit der Fruchtalterung verbundene Zunahme der Zellmembran-Mikroviskosität wirken kann. Solche Veränderungen können die Permeabilität des Gewebes sowie den Membrantransport beeinflussen (Glenn et al., 1988). Ein Einfluss von Ca^{2+} auf die Eigenschaften der Zellmembran wurde auch von anderen Autoren beschrieben. Ben Arie et al. (1982) konnten an Apfelscheiben zeigen, dass eine geringere Mikroviskosität der Membran mit einer Abnahme der Ethylenproduktion korreliert. Ähnlich konnte Marcelle (1991) an Apfelscheiben mit hohen Ca-Konzentrationen geringere ACC-Konzentrationen sowie eine geringere Ethylenproduktion feststellen. Auch Picchioni et al. (1998) fanden einen positiven Effekt von Calcium auf den Erhalt der Zellmembran bei Äpfeln.

Vorliegende Untersuchungen zur Genexpression sowie Enzymaktivität zellwandabbauender Enzyme ergaben im Kühllager eine inhibierende Wirkung der Calciuminfiltration an nahezu allen untersuchten Enzymen. So war die Genexpression von Polygalacturonase, Endoglucanase, Pectatlyase, β -Xylosidase, und β -Galactosidase in den behandelten Äpfeln deutlich niedriger als in den Kontrollfrüchten. Zwar waren hier bezüglich der Genexpression der Pektinmethylesterase keine Unterschiede zu beobachten, jedoch wurde die Aktivität des Enzyms genauso wie die Aktivität der β -Galactosidase durch die Behandlung deutlich inhibiert. Auch hier war die Wirkung im Kühllager stärker ausgeprägt als im CA-Lager.

Ein inhibierender Effekt von Calciuminfiltrationen auf die Aktivität der β -Galactosidase wird auch von Siddiqui und Bangerth (1993) bei `Golden Delicious` beschrieben, wobei steigende Ca^{2+} -Konzentration in der Infiltrationslösung die Wirkung förderten. Gleichzeitig wurden in den Zellwandfraktionen Ca-infiltrierter Früchte höhere Gehalte an Hemizellulosen, ionisch sowie kovalent gebundenen Pektinen und an Gesamtpektin sowie geringere Gehalte an freien, gelösten Pektinen festgestellt. Da nach Untersuchungen von Konno et al. (1984) die Aktivität der β -Galactosidasen sich *in vitro* mit wechselnden Ca-Konzentrationen nicht ändert, führten Siddiqui und Bangerth (1993) als mögliche Ursachen für die Wirkung von Ca-

Infiltration auf die Aktivität des Enzyms pH-Wert Veränderungen in der Zellwand an, wie von Brady (1987) vorgeschlagen wurde. Desweiteren ist es nach Ausführungen der Autoren möglich, dass durch die Quervernetzung der Pektine in der Mittellamelle mittels Calcium-Brückenbindungen der Substratzugang hydrolytischer Enzyme, vor allem von Glycosidasen, erschwert wird. Somit würde die Ca-Infiltration eine Art Substrat-limitierenden Faktor für die Aktivität der verschiedenen Enzyme darstellen.

Neben den bereits beschriebenen Ursachen für die Wirkung von Ca^{2+} auf die untersuchten Parameter spielt jedoch vermutlich auch dessen Rolle als sekundärer Botenstoff zur Übertragung extrazellulärer Signale ins Innere der Zelle eine wichtige Rolle (Poovaiah und Reddy 1987; 1990). Die steuernden Funktionen von Ca^{2+} reichen von der Regelung des Elektronentransports bis hin zum Einfluss auf die Genexpression und werden durch ein homeostatisches System, dass die innerzellulären Ca^{2+} -Konzentrationen reguliert, ermöglicht (Bush, 1995). Durch die extremen Konzentrationsunterschiede zwischen extra- und intrazellulärem Calcium (zwischen Zellwand bzw. Zellmembran und dem Cytoplasma) (Williamson und Ashley, 1982; Gilroy et al., 1990) sowie durch die Potentialunterschiede über die Zellmembran hinweg kommt es zu einem enormen elektrochemischen Gradienten für den Ca^{2+} -Fluss vom äußeren der Zelle ins Cytoplasma. Der Transport von Ca^{2+} in das Cytosol bzw. aus dem Cytosol wird mit Hilfe spezifischer Transportproteine geregelt, wobei der Efflux vor allem durch Ca^{2+} -ATPasen sowie der Influx über spezifische Ca^{2+} -Ionenkanäle erfolgt (Bush, 1995). Nach Bush (1995) sind auch Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten innerhalb des Cytosols für die Zellfunktion von Bedeutung, nicht nur während der Signalübertragung, sondern auch für die Regulierung der metabolischen Prozesse im Cytoplasma sowie in den Zellorganellen. Wie unter anderem von Poovaiah (1993) beschrieben, führt ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentrationen im Cytosol zur Aktivierung von Calmodulin, einem Calcium-bindenden, regulatorischen Protein. Dieser Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex wiederum aktiviert eine Reihe von Enzymen, wie zum Beispiel Proteinkinasen, welche eine wichtige Rolle für die Proteinphosphorylierung und somit für die Regulierung der Aktivität von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren spielen (Yang und Poovaiah, 2003). Neben Calmodulin (CaM) kommen in Pflanzen als weitere "Ca²⁺-Sensoren" Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPK) sowie Calcineurin B-like Proteine (CBL) vor, wobei Calmodulin die wichtigste Gruppe bei Eukaryonten darstellt (Yang und Poovaiah,

2003). Nach Glenn et al. (1988) existieren verschiedene Möglichkeiten, wie Ca^{2+} diverse Zellfunktionen beeinflussen kann. Zum einen kann eine Zunahme der apoplastischen Ca-Konzentrationen zur Veränderung des Ca^{2+} -Gradienten zwischen Symplast und Apoplast führen, was zu einer Zunahme des Calcium-Influx sowie dadurch zu einer Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol führen kann. Diese Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol können zu einer Reihe biochemischer Prozesse in den Zellen durch Aktivierung verschiedener Enzyme, wie NAD-Kinasen oder Ca^{2+} -ATPasen führen. Paliath und Poovaiah (1985) konnten feststellen, dass die Calcium-Calmodulin abhängige Phosphorylierung während der Fruchtalterung abnimmt, Ca-Infiltrationen jedoch diesen Prozess verzögern können.

Guan et al. (2006) untersuchten an Pfirsichen den Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -ATPase Aktivität der mikrosomalen Membran sowie der Peroxidation von Membranlipiden und der Reife bzw. Alterung der Früchte. Sie konnten an Früchten, welche bei niedrigeren Temperaturen (4°C) im Vergleich zu den Kontrollfrüchten (25°C) gelagert wurden, zusammen mit einem verbesserten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit sowie einer reduzierten Respiration eine höhere sowie länger anhaltende Aktivität der Ca^{2+} -ATPase nachweisen. Gleichzeitig zeigten diese Früchte eine reduzierte Peroxidation der Membranlipide, was sich anhand geringerer Gehalte an freiem Sauerstoff sowie an Malondialdehyd, einem Produkt der Membranlipid-Peroxidation, in den Zellen nachweisen lies. Eine Infiltration mit Ca^{2+} -ATPase-Inhibitoren bewirkte dabei eine Stimulierung der Respirationsrate. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase sowie der Zustand der Zellmembran von großer Bedeutung für die Reife- bzw. Alterungsprozesse in der Frucht zu sein scheinen.

Es wäre möglich, dass es durch Erhöhung der apoplastischen Calciumkonzentration mittels Calciuminfiltrationen zu einer Beeinflussung des Ca^{2+} -Transports in bzw. aus der Zelle und somit zu einer Beeinträchtigung der Calciumhomöostase in der Zelle bzw. der Signalübertragung kommt. Dies könnte zum Beispiel durch Veränderung des elektrochemischen Gradienten zwischen Zellmembran und Cytosol erfolgen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Calcium durch Beeinflussung der Eigenschaften der Zellmembran, wie bereits erwähnt, sowie der Aktivität von Ca^{2+} -ATPasen Einfluss auf verschiedene,

reifebezogene Prozesse in den Zellen und somit auch auf die Synthese am Reifeprozess beteiligter Proteine hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Zellwandfraktionierungen zeigten im Gegensatz zu Aussagen in der Literatur kaum Einfluss auf Veränderungen der einzelnen Fraktionen. Siddiqui und Bangerth (1993) konnten zum Beispiel, wie bereits beschrieben, an Ca-infiltrierten `Golden Delicious` Äpfeln nach der Lagerung höhere Gehalte an ionisch sowie kovalent gebundenen Pektinen, einen höheren Gehalt an Gesampektin sowie geringere Gehalte an freien, gelösten Pektinen im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Auch Ortiz et al. (2011) beobachteten nach Ca-Tauchbehandlung höhere Gehalte an CDTA-löslichen Pektinen im Vergleich zu den Kontrollfrüchten.

In der vorliegenden Arbeit konnten zum Teil zwar an den Ca-infiltrierten Äpfeln geringere Gehalte an H₂O-löslichen sowie tendenziell etwas geringere Gehalte an PAW-löslichen Pektinen gemessen werden, was auf eine gehemmte Löslichkeit der Polyuronide, wie unter anderem von Glenn und Poovaiah (1990) an `Golden Delicious` beobachtet, hinweist, jedoch waren die Unterschiede weitgehend gering. Auch bezüglich der ionisch gebundenen Pektine waren hier kaum Unterschiede zu sehen. In Einzelfällen zeigten sogar die Ca-infiltrierten Äpfel etwas geringere Gehalte an ionisch gebundenen Pektinen als die Kontrollfrüchte. Zum Beispiel im Anschluss an das Shelf-life waren nach CA-Lagerung an den 1-MCP behandelten Früchten in Kombination mit der Ca-Infiltration deutlich niedrigere Gehalte an CDTA-löslichen Pektinen zu sehen als ohne Calciuminfiltration. Ähnliches konnte unmittelbar nach Kühllagerung an Früchten ohne 1-MCP beobachtet werden. Möglicherweise ist dies zum Teil auf eine Inhibierung der Pektinmethylesteraseaktivität durch die Ca-infiltration bzw. die Kombination mit CA-Lager und 1-MCP und eine damit verbundene geringere Hydrolyse der Esterbindungen zwischen Methanol und der Carboxylgruppe der Galacturonsäurebausteine im Pektinmolekül zurückzuführen. Dadurch kann es zu einer geringeren Quervernetzung der Pektine mittels Calciumbrücken kommen. Zudem wäre es möglich, dass eine Neusynthese hoch-methylierter Pektine, wie von Massiot et al. (1996) sowie Billy et al. (2008) berichtet, zu einer Zunahme des Methylierungsgrades während der Lagerung geführt

hat, und das dieser Prozess durch die Ca-Infiltration bzw. durch die Kombination mit CA-Lager und 1-MCP zum Teil gehemmt wurde.

Entsprechend den Ergebnissen der Festigkeitsmessungen waren nach dem Shelf-life im Anschluss an die Kühlung in den Ca-infiltrierten Äpfeln, vergleichbar mit den 1-MCP behandelten Früchten, tendenziell höhere Gehalte an kovalent gebundenen Pektinen zu beobachten. Da Pektine über kovalente Bindungen mit Zellulosefibrillen sowie Hemizellulosen vernetzt sind (McCann et al., 1990), könnte dies unter anderem auf eine Inhibierung von Hemizellulasen, wie Xyloglucan-Endotransglycosylasen oder Expansin, und einen damit verbundenen, verbesserten Erhalt des Zellulose-Hemizellulose-Netzwerkes in der Zellwand zurückzuführen sein.

Die durchgeführten Untersuchungen mit Ca-Infiltrationen konnten zeigen, dass eine Erhöhung der Calciumkonzentration in der Frucht den Festigkeitsverlust von Äpfeln deutlich reduzieren kann. Die Ergebnisse legen nahe, dass neben einem direkten, Zellwandstabilisierenden Effekt der Ca^{2+} -Ionen über eine Vernetzung der Pektine mittels ionischer Bindungen vor allem auch weitere Faktoren, welche unter anderem zu einer Inhibierung von Ethylensynthese, Respiration sowie Genexpression und Aktivität zellwandabbauender Enzyme führen, eine wichtige Rolle spielen. Ein Zellmembran stabilisierender Effekt der Calciumionen könnte dabei neben anderen Möglichkeiten durch Inhibierung der Ethylensynthese hemmend auf eine Reihe weiterer, am Festigkeitsverlust beteiligter Prozesse wirken. In wie weit eine Beeinflussung der Signalübertragung in die Zelle durch Erhöhung der apoplastischen Calciumkonzentrationen von Bedeutung sein kann, ist noch weitgehend ungeklärt.

5.5 Fazit der Diskussion

Abschließend werden die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschrieben und in Bezug zu den anfangs angeführten Versuchsfragen gestellt. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Rolle von Ethylen für den Festigkeitsverlust sowie die Regulierung des Zellwandabbaus. Neben den beschriebenen physiologischen und biochemischen, den Zellwandabbau regulierenden Prozessen sind die Unterschiede bezüglich der Fruchtfleischfestigkeit bzw. des Weichwerdens der Früchte bei `Elstar` und `Pinova` auch auf anatomische Unterschiede in der Beschaffenheit der Zellen, der Zellform, -größe und -dichte sowie der Beschaffenheit der Zellwände zurückzuführen. Dazu wurden in dieser Arbeit allerdings keine Untersuchungen durchgeführt.

Wodurch unterscheiden sich Sorten mit unterschiedlich starkem Festigkeitsabbau?

Die festgestellten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Sorten sowie die Tatsache, dass alle reifeinhibierenden bzw. festigkeitserhaltenden Maßnahmen an `Elstar` größere Wirkung zeigten als an `Pinova`, deuten darauf hin, dass diese Unterschiede, zumindest zum Teil, auf eine sortenspezifische Sensitivität für Ethylen zurückzuführen sein könnten. Verschiedene Beobachtungen geben Anlass zu dieser Hypothese: So nahm unmittelbar nach der Ernte die Ethylenproduktion bei `Elstar` deutlich zu, wogegen an `Pinova` eine Abnahme zu verzeichnen war. Dies könnte vor allem darauf zurückzuführen sein, dass bei `Elstar` im Gegensatz zu `Pinova` bereits geringe Mengen an Ethylen zur Induzierung der autokatalytischen Ethylensynthese ausreichen. Dass Ethylen bei beiden Sorten eine zentrale Rolle für die Steuerung der Reifeprozesse und vor allem auch für die den Zellwandabbau und damit den Festigkeitsverlust steuernden Prozesse spielt, konnte anhand der deutlichen Wirkung aller Ethylensynthese bzw. -wirkung inhibierenden Maßnahmen gezeigt werden. Gemeint sind damit die Lagerung unter CA/ULO-Bedingungen sowie besonders der Einsatz von 1-MCP, wobei deren Wirksamkeit bei `Elstar` ausgeprägter war als bei `Pinova`. Ob Unterschiede in der Sensitivität für Ethylen sowie im Shelf-life-Verhalten der Sorten auf mögliche Mutationen wichtiger Ethylensynthese-bezogener Gene, wie ACS1-2 (Harada, 2000; Costa, 2005) oder ACO-1 (Costa, 2005) zurückzuführen sind oder ob Unterschiede in der Genexpression von Ethylenrezeptor-Proteinen, wie Md-ERS1 oder

Md-ERS2 (Tatsuki und Endo, 2006), dafür verantwortlich sind, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es wäre zudem möglich, dass, wie in Kapitel 5.1 diskutiert, zwischen beiden Sorten Unterschiede in der Anzahl bzw. Dichte an Ethylen-Rezeptoren in der Zellmembran bestehen. Eine unterschiedliche Ethylenbildungsrate beider Sorten könnte ebenfalls auf eine genetisch bedingte, schwächere Ausprägung bezüglich der Genexpression von ACC-Synthase oder ACC-Oxidase zurückzuführen sein. Die beschriebenen Faktoren könnten auch die sortenspezifische Wirkung von 1-MCP erklären.

Die Ergebnisse zeigten zudem, dass der bessere Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit bei `Pinova` im Lager vor allem auf einen verzögerten Zellwandabbau im Vergleich zu Elstar zurückzuführen ist. Dies konnte durch folgende Beobachtungen deutlich bestätigt werden:

- Die Genexpression der meisten untersuchten zellwandabbauenden Enzyme war bei `Elstar` deutlich höher als bei `Pinova`.
- `Elstar` zeigte eine vergleichsweise intensivere Abnahme an extrahierbarem Zellwandmaterial bzw. eine intensivere Zunahme an PAW-löslichen Pektinen in den Zellwandfraktionen während der Lagerung.
- Deutliche Unterschiede zwischen beiden Sorten ergaben sich in absteigender Intensität in der Genexpression von β -Galactosidase, Polygacturonase, Arabinofuranosidase sowie Expansin.
- `Elstar` zeigte eine intensivere Zunahme der β -Galactosidase-Aktivität während der Lagerung.
- `Pinova` zeigte höhere Pektinmethylesterase-Aktivität zur Ernte und während der Lagerung, was eine bessere Stabilisierung der Mittellamelle mittels Ca^{2+} -Bindungen zur Folge haben könnte.
- Ethylen spielt bei beiden untersuchten Apfelsorten eine entscheidende Rolle für die Regulierung des Zellwandabbaus, denn die Genexpression wie auch Aktivität der meisten untersuchten Enzyme wurde bei beiden Sorten signifikant durch 1-MCP reduziert.

- Die Unterschiede in der Enzymaktivität beider Sorten äußerten sich in einer intensiveren Zunahme an gelösten Pektinen während der Lagerung bei `Elstar und bestätigten letztlich für diese Sorte das schnellere Weichwerden.

Zusammenfassend sind die Unterschiede bezüglich der Texturveränderungen zwischen beiden Sorten sowohl auf physiologische, sortenspezifische Unterschiede im Reifeverhalten der Früchte, auf Unterschiede bezüglich der Synthese und Aktivität bestimmter zellwandabbauender Enzyme sowie auf mögliche Zell- bzw. Zellwand-anatomische Unterschiede zurückzuführen.

Welche Rolle spielen einzelne zellwandabbauende Enzyme für das Weichwerden beim Apfel?

Die durchgeführten Untersuchungen weisen bei folgenden Enzymen auf eine besondere Bedeutung für das Weichwerden beim Apfel hin:

- Die β -Galactosidase zeigte in ihrer Genexpression sowie Aktivität die deutlichste Korrelation mit Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit, dem Zellwandabbau sowie der Respiration und Ethylenproduktion der Früchte.

Alle Ethylensynthese- bzw. Respiration- hemmenden Maßnahmen (CA/ULO-Lagerung und Applikation von 1-MCP) führten zu einer deutlichen Inhibierung von Genexpression sowie Aktivität der β -Galactosidase, zusammen mit einer verzögerten Solubilisierung der Pektine.

- Die Ergebnisse bezüglich der Genexpression der **Arabinofuranosidase** deuten darauf hin, dass die Abspaltung von Arabinose an den Seitenketten des Pektinmoleküls eine gewisse Bedeutung für die Verbindung zwischen den Pektinmolekülen und somit für die Stabilität der Zellwand hat.

Die im Vergleich zur β -Galactosidase deutlich niedrigere Expression lässt eine vergleichsweise geringere Bedeutung des Enzyms vermuten. Die deutliche

Inhibierung der Genexpression durch 1-MCP weist auch hier auf eine ethylenabhängige Regulierung des Enzyms hin.

- Die im Vergleich zu den anderen Enzymen um ein Vielfaches höhere Genexpression der **Polygalacturonase** weist, obwohl die Rolle des Enzyms beim Apfel aufgrund der nahezu fehlenden Depolymerisation der Pektine noch weitgehend unklar ist, auf eine Bedeutung des Enzyms hin. Es wäre denkbar, dass das Enzym über eine Lockerung der Zellwandstruktur die Substratverfügbarkeit für weitere Enzyme beeinflusst.

Eine ethylenabhängige Regulierung des Enzyms konnte nach 1-MCP Anwendung auf die Genexpression nachgewiesen werden.

- Die Aktivität der **Pektinmethylesterase** nahm während der Lagerung zu. Alle den Festigkeitsverlust reduzierenden Maßnahmen führten zu einer Inhibierung der Enzymaktivität. Das stabilere Shelf-life bei `Pinova` könnte auf die im Vergleich zu `Elstar` höhere PME-Aktivität zurückzuführen sein, was eine Stabilisierung der Mittellamelle durch die Bildung von "Ca²⁺-egg-box-Strukturen" begünstigt.
- Trotz scheinbar fehlender Depolymerisation von Hemizellulosen beim Apfel geben die Ergebnisse Hinweise auf eine Bedeutung von **Xyloglucan-Endotransglycosylase** und **Expansin**. Bei der Xyloglucan-Endotransglycosylase korrelierte vor allem die Expression von Md-XTH10 positiv mit den Festigkeitsveränderungen der Früchte. Eine ähnliche Korrelation zeigte sich auch bei dem für Expansin kodierenden Gen Md-EXP2. Die Rolle der beiden Enzyme ist möglicherweise auf eine Lockerung des Zellulose-Hemizellulose Netzwerkes in der Zellwand und einen damit indirekten Einfluss auf weitere, zellwandabbauende Enzyme, z. B. durch Beeinflussung der Substratverfügbarkeit, zurückzuführen.

Die Abnahme der Genexpression beider Enzyme während der Lagerung sowie die hohen Werte zur Ernte legen nahe, dass sowohl Xyloglucan-Endotransglycosylasen wie auch Expansin vor allem zu Beginn des Weichwerdens von Bedeutung zu sein scheinen.

- Bezüglich **Pectatlyase**, **Endoglucanase** sowie **β -Xylosidase** lassen die Ergebnisse noch keine eindeutige Aussage über deren Bedeutung für die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel zu.

Untersuchungen zur Enzymaktivität wurden in der vorliegenden Arbeit nur für die β -Galactosidase sowie die Pektinmethylesterase durchgeführt. Diesbezügliche Analysen für die weiteren in dieser Arbeit untersuchten Enzyme könnten die Erkenntnisse zu deren Bedeutung für die Festigkeitsveränderungen beim Apfel verbessern. Man kann jedoch davon ausgehen, dass nicht die Aktivität eines einzelnen Enzyms, sondern das Zusammenspiel und die Interaktion verschiedener Enzyme letztendlich für den Abbau der Zellwandstrukturen und damit für Texturveränderungen der Frucht verantwortlich sind.

Welches sind die physiologischen Ursachen für die Wirkung von Lagerverfahren auf die Fruchtfleischfestigkeit beim Apfel?

Bezüglich des Einflusses der Lagerverfahren auf die am Zellwandabbau beteiligten Prozesse konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

- Die Lagerung bei CA- bzw. ULO-Bedingungen führte zu einem deutlich verbesserten Festigkeitserhalt der Früchte zusammen mit einer Inhibierung der Genexpression sowie der Enzymaktivität der meisten untersuchten Enzyme.
- Bei `Pinova` waren zum einen bezüglich der Wirkung von CA- und ULO-Bedingungen kaum Unterschiede zu beobachten. Zum anderen konnte durch beide Lagermethoden sowie durch den Einsatz von 1-MCP der Reife- bzw. Festigkeitsabbau fördernde Effekt leicht erhöhter Temperaturen weitgehend kompensiert werden. Dies eröffnet der Praxis die Möglichkeit zu energie- und damit kostensparenden Lagerverfahren wie der CA-Lagerung in Kombination mit 1-MCP bei erhöhten Temperaturen (z.B. 4°C anstelle von 1°C).
- Die verschiedenen reifeinhibierenden Maßnahmen führten zu deutlichen Unterschieden zwischen beiden Sorten vor allem in Bezug auf die Ethylenproduktion,

wogegen der hemmende Effekt auf die Respiration bei beiden Sorten in etwa vergleichbar war. Dies zeigt, dass vor allem Ethylen eine zentrale Rolle für die Steuerung der am Zellwandabbau beteiligten Prozesse spielt, was durch den hemmenden Effekt von 1-MCP auf die Genexpression sowie Enzymaktivität untermauert werden konnte.

- Die Ergebnisse weisen zudem auf eine Bedeutung der Fruchtatmung für die Genexpression bzw. Aktivität der Enzyme bzw. eine zum Teil Ethylen-unabhängige Regulierung der Enzyme hin.

Möglicherweise ist eine durch 1-MCP nicht vollständig gehemmte Respiration zum Erhalt der Genexpression bzw. Enzymaktivität ausreichend oder bereits geringste Mengen an Ethylen genügen zur Regelung der entsprechenden Prozesse.

- Dass die hemmende Wirkung der CA/ULO-Bedingungen auf die untersuchten Enzyme zu einem verzögerten Zellwandabbau geführt hat, konnten die Ergebnisse der Zellwandfraktionierungen zeigen.

Auf welchen physiologischen Ursachen basiert die zum Teil nahezu komplette Inhibierung des Festigkeitsabbaus durch 1-MCP?

Wichtige Erkenntnisse bezüglich der Rolle von Ethylen für die den Zellwandabbau regulierenden Prozesse konnten in den durchgeführten Untersuchungen anhand des Einsatzes von 1-MCP gewonnen werden:

- Der inhibierende Effekt von 1-MCP zeigte bei beiden Sorten, dass der Abbau der Fruchtfleischfestigkeit, die CO₂- und Ethylenbildung sowie die Genexpression und Aktivität der meisten untersuchten pektolytischen Enzyme größtenteils durch Ethylen reguliert werden.
- Die Wirkung von 1-MCP zeigte deutliche Abhängigkeit vom Applikationstermin. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies vor allem auf eine Hemmung der vermutlich

ebenfalls ethylenabhängigen Neusynthese von Ethylenrezeptoren bei früher Applikation zu Beginn des Klimakteriums zurückzuführen ist.

- Die nachlassende Wirkung von 1-MCP nach längerer Lagerung ist vermutlich eher auf eine Neusynthese von Ethylenrezeptoren als auf eine Lockerung der 1-MCP-Rezeptor-Bindung bzw. eine Verdrängung der 1-MCP-Moleküle an den Rezeptoren durch Ethylen zurückzuführen.
- Die Rolle von Ethylen für die Respiration der Früchte scheint mit der ethylenabhängigen Synthese von an der Fruchtatmung beteiligten Enzymen zusammenzuhängen.
- Bei Sorten mit stabiler Fruchtfleischfestigkeit im Lager, wie `Pinova`, bringt die Anwendung von 1-MCP zum Teil nur geringe Wirkung. Jedoch kann an diesen Sorten eine Kombination aus Kühllager und 1-MCP, zumindest für eine bestimmte Lagerdauer, als Alternative zum technisch aufwendigeren CA-Lager angewendet werden.
- Die nahezu vollständige Inhibierung von Genexpression sowie Enzymaktivität in Korrelation mit der Ethylenproduktion erklärt die zum Teil vollständige Hemmung des Festigkeitsabbaus durch 1-MCP.

Die anhand der Zellwandfraktionierungen nachgewiesene verzögerte Solubilisierung der Pektine sowie der verbesserte Erhalt ionisch sowie kovalent gebundener Pektine in den 1-MCP behandelten Früchten unterstreichen diese Hypothese.

Welche Rolle spielt Calcium für Texturveränderungen beim Apfel während der Lagerung?

Die Versuche mit Ca-Infiltrationen führten zu folgenden Erkenntnissen bezüglich der Bedeutung bzw. Wirkung von Ca^{2+} :

- Der positive Einfluss der Ca-Infiltrationen auf den Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit sowie den Abbau der Pektinstrukturen stützt die Hypothese eines direkten, stabilisierenden Einflusses von Ca^{2+} auf die Vernetzung der Pektine mittels Ca^{2+} -Brückenbindungen.
- Der zusätzlich beobachtete, deutlich inhibierende Effekt auf die Ethylen- und CO_2 -Produktion sowie die Genexpression und Aktivität der meisten untersuchten zellwandabbauenden Enzyme zeigt, dass die Wirkung von Ca^{2+} über einen direkten, Zellwand-stabilisierenden Effekt hinaus geht.
- Die nachgewiesene Ethylen-abhängige Regulierung der meisten untersuchten, zellwandabbauenden Enzyme sowie die Tatsache, dass die Infiltration mit CaCl_2 zu einer deutlichen Hemmung der Fruchtreife führte, deuten darauf hin, dass der Einfluss von Ca^{2+} auf die Ethylenbiosynthese eine wichtige Rolle für die Regulierung der Zellwand-abbauenden Prozesse spielt.
- Dieser Effekt könnte unter anderem auf eine Membran-stabilisierende und dadurch die Kompartimentierung erhaltende und den Membrantransport beeinflussende Wirkung, auf pH-Wert Veränderungen in der Zellwand, auf eine Beeinflussung der Exozytose-Prozesse und damit reduzierte Absonderung von Enzymen an der Zellwand oder auf einen substratlimitierenden Effekt durch Stabilisierung der Pektinstrukturen zurückzuführen sein.
- Ca^{2+} wirkt möglicherweise über eine Beeinflussung der Calciumhomöostase in der Zelle bzw. des Calciumtransports in sowie aus der Zelle, wodurch die biochemischen Prozesse im Cytoplasma sowie in den Zellorganellen, wie die Synthese von Proteinen oder die Regulierung der Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren gesteuert werden.

Ca-Spritzungen dienen im Obstbau, vor allem an Ca-Mangel-anfälligen Sorten, als Standardmaßnahme zur Reduzierung physiologischer Lagerkrankheiten wie Stippigkeit oder Lentizellenflecken. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Ca^{2+} neben einer Fruchtgewebe stabilisierenden Wirkung auch eine deutliche Inhibierung der Reifeprozesse sowie des Weichwerdens der Frucht im Lager bewirken kann. In den durchgeführten Untersuchungen war diesbezüglich die Wirkung der CaCl_2 -Infiltration teilweise vergleichbar mit dem hemmenden Effekt von 1-MCP. Einen limitierenden Faktor stellt jedoch in der Praxis eine ausreichende Erhöhung der Calciumaufnahme in die Frucht dar. Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von Calcium bei Entwicklung geeigneter Maßnahmen ein deutliches Potential zur Verbesserung der Haltbarkeit von Äpfeln im Lager bieten könnte.

6 Zusammenfassung

Die Fruchtfleischfestigkeit stellt beim Apfel eines der wichtigsten Qualitätskriterien sowohl für den Handel als auch für den Konsumenten dar. Entwicklungen in der Lagertechnik in den vergangenen Jahren bzw. Jahrzehnten, wie die Einführung der CA- bzw. ULO-Lagerung oder der Einsatz von 1-MCP, haben zu einer deutlichen Verbesserung der Lagermöglichkeiten beigetragen. Maßnahmen zur Qualitätserhaltung zielen darauf ab, die reifebezogenen Prozesse in der Frucht zu steuern und dadurch unter anderem einen verbesserten Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit zu erreichen.

Das Weichwerden der Früchte während der Lagerung ist vor allem auf den Abbau von Zellwand-Polysacchariden sowie auf den Verlust der polymeren Netzwerkstruktur der Zellwand zurückzuführen. Diese Prozesse werden durch eine Reihe zellwandabbauender Enzyme katalysiert. Trotz intensiver Forschung zum Thema Fruchtfleischfestigkeit sowie zur Wirkung von Vorernte-, Ernte und Nacherntefaktoren auf die Fruchtfleischfestigkeit sind die biochemischen und physiologischen Ursachen für deren Wirkung noch teilweise ungeklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit in Zusammenhang mit dem Zellwandabbau beim Apfel während der Lagerung genauer zu untersuchen. Besonderes Augenmerk galt dabei der zentralen Rolle von Ethylen für die Steuerung der reifebezogenen Texturveränderungen. Dabei wurden die wichtigsten, die Fruchtfleischfestigkeit beeinflussenden Faktoren und deren Wirkung auf Veränderungen im Bereich der Zellwände, die Aktivität und Genexpression zellwandabbauender Enzyme sowie die Fruchtreife beim Apfel genauer untersucht. Anhand der beiden Sorten `Elstar` und `Pinova` wurden in den Untersuchungen exemplarisch die Unterschiede zwischen Sorten mit stabiler bzw. weniger stabiler Fruchtfleischfestigkeit im Lager bzw. Shelf-life herausgestellt:

Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Unterschiede zwischen Sorten mit unterschiedlicher Lagerstabilität scheinen zum Teil auf einer unterschiedlichen Sensitivität für Ethylen zu beruhen. Dies zeigte sich unter anderem dadurch, dass alle Ethylensynthese- bzw. -wirkung inhibierenden Maßnahmen, wie die

Lagerung unter CA/ULO-Bedingungen oder der Einsatz von 1-MCP, bei der Sorte `Elstar` eine intensivere Wirkung hatten als bei `Pinova`.

- Der bessere Erhalt der Fruchtfleischfestigkeit bei `Pinova` im Lager lässt sich vor allem auf einen verzögerten Zellwandabbau im Vergleich zu `Elstar` zurückführen. Dies zeigte sich in der deutlich höheren Genexpression der meisten untersuchten zellwandabbauenden Enzyme, der höheren Aktivität der β -Galactosidase, sowie der intensiveren Abnahme an extrahierbarem Zellwandmaterial bzw. einer intensiveren Zunahme an gelösten Pektinen während der Lagerung bei `Elstar`.

- Das im Vergleich zu `Elstar` stabilere Shelf-life der Sorte `Pinova` könnte, zumindest zum Teil, auf die an `Pinova` gemessene höhere Aktivität der Pektinmethylesterase zurückzuführen sein, wodurch eine Abspaltung der Methylester am Pektinmolekül und eine Vernetzung der Pektine mittels Ca^{2+} -Brücken ermöglicht wird. Hinweise darauf lieferte in der vorliegenden Arbeit die mit dem Anstieg der PME-Aktivität korrelierende Zunahme an ionisch gebundenen Pektinen bei `Pinova`.

- Neben den physiologischen Aspekten sind Sortenunterschiede vermutlich auch auf Zell- bzw. Zellwand-anatomische Unterschiede zurückzuführen. Diesbezügliche Hinweise zeigten sich in den deutlich höheren Gehalten an extrahierbarem Zellwandmaterial bei `Pinova` bereits zur Ernte.

- Unter den untersuchten Enzymen korrelierte am deutlichsten die Genexpression sowie Aktivität der β -Galactosidase mit dem Zellwandabbau sowie den Veränderungen der Fruchtfleischfestigkeit. Dies weist darauf hin, dass die Abspaltung von Galactose an den Seitenketten des Pektinmoleküls von Bedeutung für den Zellwandabbau beim Apfel ist.

- Zudem ergaben sich deutliche Hinweise auf eine Bedeutung von Arabinofuranosidasen, Polygalacturonasen, Pektinmethylesterasen, Xyloglucan-Endotransglycosylasen sowie Expansin für Texturveränderungen beim Apfel.

- Der Reife- bzw. Festigkeitsabbau- fördernde Effekt erhöhter Temperaturen im Lager konnte bei Anwendung von CA/ULO-Bedingungen in Kombination mit dem Einsatz von 1-MCP zum

Teil kompensiert werden, was vor allem in Hinblick auf potentielle Energiesparmaßnahmen bei der Lagerung von Interesse ist.

- Der inhibierende Effekt von Ethylensynthese- bzw. -wirkung hemmenden Maßnahmen auf die Fruchtfleischfestigkeit, die CO_2 - sowie Ethylenbildung, die Genexpression und Aktivität der meisten untersuchten Enzyme sowie auf den Pektinabbau in der Zellwand zeigt deutlich, dass die genannten Prozesse und Veränderungen größtenteils durch Ethylen reguliert werden.

- Die Wirkung von 1-MCP zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom Applikationstermin. Bei früher Anwendung des Ethyleninhibitors vor bzw. zu Beginn des klimakterischen Ethylenanstiegs könnte auch die Neusynthese von Rezeptoren, welche ebenfalls Ethylenabhängig zu erfolgen scheint, gehemmt werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die zum Teil vollständige Hemmung der Reifeprozesse nach 1-MCP Anwendung. Zudem könnte dies darauf hindeuten, dass die nachlassende Wirkung von 1-MCP nach längerer Lagerung vermutlich eher auf eine Neusynthese von Ethylenrezeptoren als auf eine Lockerung der 1-MCP-Rezeptor-Bindung bzw. eine Verdrängung der 1-MCP-Moleküle an den Rezeptoren durch Ethylen zurückzuführen ist.

- Die Kombination aus Kühlagerung und 1-MCP-Anwendung kann, zumindest für eine bestimmte Lagerdauer sowie für bestimmte Sorten, als Alternative zum technisch aufwendigeren CA-Lager angewendet werden.

- Die nahezu vollständige Inhibierung von Genexpression sowie Enzymaktivität zusammen mit der Inhibierung der Ethylenbiosynthese erklärt die zum Teil vollständige Hemmung des Festigkeitsabbaus durch 1-MCP. Die anhand der Zellwandfraktionierungen nachgewiesene verzögerte Solubilisierung der Pektine sowie der verbesserte Erhalt ionisch sowie kovalent gebundener Pektine in den 1-MCP behandelten Früchten unterstreichen diese Hypothese.

- Die Versuche mit Calciuminfiltrationen konnten die Hypothese einer direkten, stabilisierenden Wirkung von Ca^{2+} auf die Vernetzung der Pektine mittels Ca^{2+} -

Brückenbindungen und einen damit verbundenen positiven Einfluss bezüglich der Reduzierung des Festigkeitsverlustes der Äpfel bestätigen.

- Der zusätzliche inhibierende Effekt der Ca-Infiltrationen auf Ethylen- und CO₂-Produktion sowie auf die Genexpression und Aktivität der meisten untersuchten Enzyme weist auf eine über einen direkten, Zellwand-stabilisierenden und Kompartimentierung erhaltenden Effekt hinaus gehende Wirkung von Ca²⁺ hin. Mögliche Ursachen wie z.B. eine Zellmembran stabilisierende und damit Membrantransport beeinflussende Wirkung von Ca²⁺ oder eine Beeinflussung der Wirkung von Ca²⁺ als sekundärer Botenstoff zur Übertragung von Signalen in die Zelle sowie innerhalb der Zelle werden im Rahmen der Arbeit diskutiert.

- Basierend auf den erzielten Ergebnissen werden praktische Aspekte der Obstlagerung, wie die Möglichkeit des Einsatzes energiesparender Lagerverfahren, die Optimierung von CA-Bedingungen, die Durchführung von Calciumbehandlungen zur Verbesserung der Lagerfähigkeit sowie die Anwendung des Ethyleninhibitors 1-MCP bei verschiedenen Apfelsorten herausgestellt.

Summary

Firmness is one of the most important quality criteria of apple fruit, both for the marketing supply chain as well as for the end consumer. Developments in fruit storage techniques, like the introduction of controlled atmosphere storage or ultra low oxygen conditions or the use of the ethylene-inhibitor 1-MCP have made important improvements to help maintain fruit quality. Methods to maintain fruit quality aim to manipulate ripening related processes in the fruit and thereby, among other parameters, to maintain firmness.

Fruit softening during storage is mainly related to the degradation of cell wall polysaccharides and to the loss of the polymeric network structure of the cell wall. These processes are catalyzed by a number of cell wall degrading enzymes. Despite a lot of research concerning the influence of pre-harvest, harvest and post-harvest factors there is still a poor understanding of the biochemical and physiological processes behind fruit softening.

This work aimed to investigate changes in firmness together with the degradation of the cell wall structure during apple storage. The experimental focus was directed to the role of ethylene as a regulator of ripening related changes in fruit texture. Thereby, the most important factors affecting flesh firmness and softening and their influence on cell wall changes, the gene expression and activity of cell wall degrading enzymes and ripening processes were analyzed.

Using the two apple cultivars `Elstar` and `Pinova` differences between rapid softening or slower softening and differing shelf-life characteristics were able to be investigated.

The most important results from this work can be summarized as follows:

- Differences between cultivars with different softening characteristics are partly due to differences in their sensitivity to ethylene. This is shown by the fact, that all ethylene-synthesis or –action inhibiting treatments, like storage under CA- or ULO-conditions or the use of 1-MCP, were more effective for `Elstar` than for `Pinova`.

- The less intensive softening of `Pinova` during storage can be explained by a delay in the loss of cell wall integrity compared to `Elstar`. This was shown by the higher gene expression level for most of the enzymes analyzed in this work, by a higher β -galactosidase activity, as well as by a stronger decrease in the total amount of extractable cell wall material and an increase in solubilized pectins during storage of `Elstar` when compared to `Pinova`.
- The better shelf-life of `Pinova` compared to `Elstar` can be explained, at least partially, by a higher activity of pectinmethylesterase (PME), which catalyzes the removal of methylester groups from the pectin side chains and allows the aggregation of pectins via Ca^{2+} binding to free carboxylic acid groups. There was good evidence for this in the correlation between the rise of PME activity and the increase of ionically bound pectins found in `Pinova`.
- Besides the physiological aspects, there is evidence that cultivar differences are also due to cell- or cell wall- anatomical differences. Indications for this supposition were found in the higher total amount of extractable cell wall material in `Pinova` apples already present at harvest.
- Among the enzymes analyzed in this work, mainly the gene expression and activity of β -galactosidase were correlated with the degradation of pectic polyuronides and the changes in softening behaviour. This suggests that the loss of galactose from the pectin side chains plays an important role in cell wall breakdown in apples.
- In addition, there is evidence that arabinofuranosidases, polygalacturonases, pectinmethylesterases, xyloglucan-endotransglycosylases and expansins are involved in the softening process of apples.
- The ripening and softening effects induced by increased temperatures during storage were partially compensated by CA- or ULO-conditions and by the application of 1-MCP, which is of interest in regard to potential energy savings during storage.
- The effects of ethylene-synthesis and -action inhibition methods on softening, CO_2 - and ethylene-production, gene expression and the activity of the most analyzed enzymes as well

as on the degradation of pectic polysaccharides in the cell wall clearly shows that these processes are mainly regulated by ethylene.

- The effect of 1-MCP was significantly dependent on application timing. When fruit are treated early, before or at the beginning of the climacteric ethylene rise, the *de novo* synthesis of ethylene receptors, which also seems to be an ethylene dependent process, might be inhibited. This could be a possible explanation for the complete inhibition of the ripening process, which sometimes can be observed after 1-MCP treatment. In addition, this could also indicate that the loss of the 1-MCP effect with increasing storage duration is due rather to the *de novo* synthesis of ethylene receptors than to a loosening of 1-MCP-receptor-binding or to a replacement of 1-MCP-molecules at the receptor level by ethylene.

- The combination of regular air storage with 1-MCP is, at least for a certain storage period, an alternative to the technically more complex CA-storage.

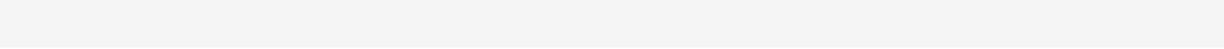
- The nearly complete inhibition of gene expression and enzyme activity together with the inhibition of ethylene-biosynthesis can, at least partially, explain a complete inhibition of softening by 1-MCP. The observed delay in pectin solubilization as well as the delayed decrease of ionically and covalently bound pectins in 1-MCP treated fruit, support this hypothesis.

- The experiments with calcium infiltration confirmed the hypothesis of a direct, stabilizing effect of Ca^{2+} cations on the pectin network via Ca^{2+} -bonds and resulting in a positive effect to maintain firmness of the apple fruit.

- The inhibitory effect of CaCl_2 infiltration on ethylene- and CO_2 - production as well as on gene expression and activity of most of the enzymes analyzed indicates that Ca^{2+} has a mode of action beyond a direct cell-wall stabilizing effect.

Other possible mechanisms, as for example, a cell membrane-stabilizing effect to influence membrane transport or an influence on the action of Ca^{2+} cations as secondary messengers for signal transduction into the cell as well as within the cell are discussed in this work.

- Based on the results obtained in this work the practical aspects of fruit storage for different apple cultivars are discussed in relation to: potential energy savings during storage; optimization of CA- conditions; calcium applications to improve storability; as well as the use of the ethylene-inhibitor 1-MCP.



8 Literaturverzeichnis

- ABELES, F.B., TAKEDA, F., 1990: Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Sci. Hort.* 42: 269–275.
- ABELES, F.B., BILES, C.L., 1991: Cellulase activity in developing apple fruits. *Scientia Horticulturae* 47: 77-87.
- ADAMS, D. O., YANG, S. F., 1979: Ethylene biosynthesis: Identification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 6: 170-174.
- AHMED, E. A., LABAVITCH, J. M., 1980: Cell wall metabolism in ripening fruit II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening Bartlett pears. *Plant Physiol.* 65: 1014-16.
- ALEXANDER, L., GRIERSON, D., 2002: Ethylene biosynthesis and action in tomato: A model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53: 2039-2055.
- ALI, Z.M., Brady, C.J., 1982: Purification and characterization of polygalacturonases of tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 155-169.
- ARROWSMITH, D.A., DE SILVA, J., 1995: Characterization of two tomato fruit-expressed cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylases. *Plant Mol. Biol.* 28: 391–403.
- ASADA, K., OHBA, T., TAKAHASHI, S., KATO, I., 1999: Alteration of fruit characteristics in transgenic tomatoes with modified gene expression of endo-xyloglucan transferase. *HortScience* 34: 533.
- ATKINSON, R.G., JOHNSTON, S.L., YAUK, Y.K., SHARMA, N.N., SCHROEDER, R., 2009: Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. *Posth. Biol. Technol.* 51: 149–157.
- AWAD, M., YOUNG, R.E., 1979: Post harvest variation in cellulase, polygalacturonase and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill. cv Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* 64: 306–308.
- BAI, J., BALDWIN, E.A., GOODNER, K.L., MATTHEIS, J.P., BRECHT, J.K., 2005: Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. *HortScience* 40: 1534–1538.
- BALOGH, A., KONCZ, T., TISZA, V., KISS, E., HESZKY, L., 2005: The effect of 1-MCP on the expression of several ripening-related genes in strawberries. *HortScience* 40: 2088-2090.
- BANGERTH, F., DILLEY, D.R., DEWEY, D.H., 1972: Effect of post harvest calcium treatments on internal breakdown and respiration of apple fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 679-682.
- BANGERTH, F., 1979: Calcium related physiological disorders of plants. *Ann. Rev. Phytopath.* 17: 97-122.
- BANKS, N.H., 1984: Studies of the banana fruit surface in relation to the effects of TAL Pro-long coating on gaseous exchange. *Sci. Hort.* 24: 279-286.

- BARITELLE, A.L., HYDE, G.M., FELLMAN, J.K., VARITH, J., 2001: Using 1-MCP to inhibit the influence of ripening on impact properties of pear and apple tissue. *Posth. Biol. Technol.* 23: 153–60.
- BARON-EPEL, O., GHARYAL, P.K., SCHINDLER, M., 1988: Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175: 389–395.
- BARTLEY, I.M., 1974: β -Galactosidase activity in ripening apples. *Phytochem.* 13: 2107-2111.
- BARTLEY, I.M., 1978: Exo-polygalacturonase of apple. *Phytochem.* 17: 213-216.
- BARTLEY, I.M., KNEE, M., 1982: The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.* 9: 47-58.
- BATISSE, C., BURET, M., COULOMB, P. J., 1996: Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *J. Agric. Food Chem.* 44: 453–457.
- BELDMAN, G., SCHOLS, H.A., PITSON, S.M., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.J.F., VORAGEN, A.G.J. 1997: Arabinans and arabinan degrading enzymes. In: R.J. Sturgeon (Ed.), *Advances in Macromolecular Carbohydrate Research*, Vol. 1. Jai Press, Greenwich, 1–64.
- BENEN, J.A.E.; VAN ALEBEEK, G.J.W.M, VORAGEN, A.G.J., 2003: *Handbook of Food Enzymology*. New York, Basel.
- BEN-ARIE, R., LURIE, S., MATTOKO, A.K., 1982: Temperature-dependent inhibitory effects of calcium and spermine on ethylene biosynthesis in apple discs correlate with changes in microsomal membrane microviscosity. *Plant Sci. Lett.* 24: 239-247.
- BEWLEY, J.D., BANIK, M., BOURGAULT, R., FEURTADO, J.A. TOOROP, P., HILHORST, H.W., 2000: Endo- β -mannase activity increases in the skin and outer pericarp of tomato fruits during ripening. *J. Exp. Bot.* 51: 529-538.
- BIALE, J.B., 1960. Respiration of fruits. In: W. Ruhland (Ed.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 12. Springer, Berlin, 536-592.
- BINDER, B.M., BLEECKER, A.B., 2003: A model for ethylene receptor function and 1 methylcyclopropene action. *Acta Hort.* 628: 177-187.
- BILLY, L., MEHINAGIC, E., ROYER, G., RENARD, C.M.G.C., ARVISENET, G., PROST, C., JOURJON, F., 2008: Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Posth. Biol. Technol.* 47: 315-324.
- BLANKENSHIP, S.M., DOLE, J.M., 2003: 1-methylcyclopropene: A review. *Posth. Biol. Technol.* 28: 1–25.
- BLANPIED, G. D., BRAMLAGE, W. J., DEWEY, D. H., LaBELLE, R.L., MASSEY, L.M., MATTUS, G.E., STILES, W.C., WATADA, A.E., 1978: A standardized method for collecting apple pressure test data. *New York's Food Life Sci. Bull.* 72: 8.
- BONGHI, C., FERRARESE, L., RUPERTI, B., TONUTTI, P., RAMINA, A., 1998: Endo- β -1,4-glucanases are involved in peach fruit growth and ripening, and regulated by ethylene. *Physiol. Plant* 102: 346–352.

- BOTONDI, R., DE SANTIS, D., BELLINCONTRO, A., VIZOVITIS, K., MENCARELLI, F., 2003: Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1189–1200.
- BOURNE, M.C., 1979: Texture of temperate fruits. *J. Text. Stud.* 10: 25-44.
- BRAAM, J., 1992: Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in cultured *Arabidopsis* cells: Induction by calcium and heat shock. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 3213–3216.
- BRACKMANN, A., STREIF, J., BANGERTH, F., 1995: Einfluss von CA- bzw. ULO-Lagerbedingungen auf Fruchtqualität und Reife bei präklimakterisch und klimakterisch geernteten Äpfeln. II: Auswirkung auf Ethylen-, CO₂-, Aroma- und Fettsäureproduktion. *Gartenbauwissenschaft* 60: 1-6.
- BRADFORD, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram-quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRADY, C.J., 1987: Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38: 155-178.
- BRAMLAGE, W.J., DRAKE, M., WEIS, S.A., MARMO, C.A., 1983: The effects of mineral nutrition on keeping quality of 'McIntosh' apples being grown in Massachusetts. *Proc. 89th Annu. Meeting. Mass. Fruit Grow. Assoc.* 89: 122-133.
- BROWN, R.M., 1996: The biosynthesis of cellulose. *J. Macromol. Sci.* 10, 1345–1373.
- BRUMMELL, D.A., LABAVITCH, J.M., 1997: Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiol.* 115: 717–725.
- BRUMMELL, D.A., HALL, B.D., BENNETT, A.B., 1999a: Antisense suppression of tomato endo-1,4- β -glucanase *Cel2* mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Mol. Biol.* 40: 615–622.
- BRUMMELL, D.A., HARPSTER, M.H., CIVELLO, P.M., PALYS, J.M., BENNETT, A.B., DUNSMUIR, P., 1999b: Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11: 2203–2216.
- BRUMMELL, D.A., HARPSTER, M.H., 2001: Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molec. Biol.* 47: 311-340.
- BRUMMELL, D.A., CIN, V.D., CRISOSTO, C.H., LABAVITCH, J.M., 2004: Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55: 2029-2039.
- BRUMMELL, D.A., 2006: Primary cell wall metabolism during fruit ripening. *NZ J. Forest. Sci.* 36: 99-111.
- BUFLER, G., STREIF, J., 1986: Ethylene biosynthesis of 'Golden Delicious' apples stored in different mixtures of carbon dioxide and oxygen. *Sci. Hortic.* 30: 177-185.
- BURG, S.P., BURG, E.A., 1962: Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol.* 37: 179–189.

- BURG, S.P., BURG, E.A., 1967: Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* 42: 144–152.
- BURG, S.P., CLAGETT, C.O., 1967: Conversion of methionine to ethylene in vegetative tissue and fruits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 125-130.
- BURG, S.P., 2004: Postharvest physiology and hypobaric storage of fresh produce, Cab Intl Verlag, Wallingford, D.K. pp. 654.
- BUSH, D.S., 1995: Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95–122.
- CABRERA, J.C., Boland, A., MESSIAEN, J., CAMBIER, P., Van CUTSEM, P., 2008: Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology Vol. 18, 6:* 473–482.
- CARPITA, N.C., 1987: The biochemistry of 'growing' cell walls. In: D.J. Cosgrove, D.P. Knievel (Eds.), *Physiology of Cell Expansion during Plant Growth*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 28 -45.
- CARPITA, N.C., GIBEAUT, D.M., 1993: Structural models of the primary cell walls of flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1–30.
- CARPITA, N., McCANN, M., 2000: The cell wall. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 52–108.
- CARRINGTON, C.M.S., GREVE, L.C., LABAVITCH, J.M., 1993: Cell wall metabolism in ripening fruit. VI. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. *Plant Physiol.* 103: 429–434.
- CHANG, S., PUREAR, J., CAIRNEY, J., 1993: A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molec. Biol. Report.* 11: 113-116.
- CHAVES, A.R., THOMAS, J.O., 1984: Effect of a brief CO₂ exposure on ethylene production. *Plant Physiol.* 76: 88-91.
- CHEN, N.J., PAULL, R.E., 2003: Endoxylanase expressed during papaya fruit ripening: Purification, cloning, and characterization. *Funct. Plant Biol.* 30: 433-441.
- CIN, V.D., RIZZINI, F.M., BOTTON, A., TONUTTI, P., 2006: The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Posth. Biol. Technol.*, 42: 125–133.
- CIVELLO, P.M., POWELL, A.L.T., SABEHAT, A., BENNETT, A.B., 1999: An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 121: 1273–1279.
- CLEMPUT, G., HESSING, M., VAN OORT, M., DECONYNCK, M., DELCOUR, J.A., 1997: Purification and characterization of a β-D-xylosidase and endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiol.* 113: 377–386.
- COSGROVE, D.J., 1997: Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 171–201.

- COSGROVE, D.J., 2000: Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 109–124.
- COSTA, F., STELLA, S., VAN DE WEG, W.E., GUERRA, W., CECCHINEL, M., DALLAVIA, J., KOLLER, B., SANSVINI, S., 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.
- CROUCH, E.M., HUYSAMER, M., 2010: Cell wall compositional differences between mealy and non-mealy 'Forelle' pear during ripening. *Acta Hort.* 877: 1005-1010.
- CUADRADO, Y., FERNANDEZ, M., RECIO, E., APARICIO, J.F., MARTIN, J.F., 2004: Characterization of the ask-asd operon in aminoethoxyvinylglycine-producing *Streptomyces* sp. NRRL 5331. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 228-236.
- CUTILLAS-ITURRALDE, A., ZARRA, I., FRY, S.C., LORENCES, E.P., 1994: Implication of persimmon fruit hemicellulose metabolism in the softening process. Importance of xyloglucan endotransglycosylase. *Physiol. Plant.* 91: 169-176.
- DAAS, P.J., VORAGEN, A.G., SCHOLS, H.A., 2000: Characterization of non-esterified galacturonic acid sequences in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydr. Res.* 326: 120–129.
- DARLEY, C.P., FORRESTER, A.M., McQUEEN-MASON, S.J., 2001: The molecular basis of plant cell wall expansion. *Plant Mol. Biol.* 47: 179–195.
- DAVIES, D.D., GREGO, S., KENWORTHY, P., 1974: The control of the production of lactate and ethanol by higher plants. *Planta* 118: 297-310.
- DE ELL, J.R., MURR, D.P., PORTEOUS, M.D., VASANTHA RUPASINGHE, H.P., 2002: Influence of temperature and duration of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. *Postharvest Biology and Technology*, 24 (3): 349-353.
- Delinsee, H., 1976: Thin-layer isoelectric focusing of multiple forms of tomato pectin esterase. *Phytoch.* 15: 903-906.
- DEFILIPPI, B.G., DANDEKAR, A.M., KADER, A.A., 2004: Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica Borkh.*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5694-5701.
- DELLA PENNA, D., ALEXANDER, D.C., BENNETT, A.B., 1986: Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: Analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 6420-6424.
- DELLA PENNA, D., LASHBROOK, C.C., TOENJES, K., GIOVANNONI, J.J., FISCHER, R.L., BENNETT, A.B., 1990: Polygalacturonase isozymes and pectin depolymerisation in transgenic rin tomato fruit. *Plant Physiol.* 94: 1882-1886.
- DETERMANN, H., 1967: *Gelchromatographie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- DE VEAU E.J., GROSS K.C., HUBER, D. J., WATADA, A., 1993: Degradation and solubilization of pectin by beta-galactosidases purified from avocado mesocarp. *Physiol. Plant.* 87: 279-285.

- DE WILD, H.P.J., WOLTEING, E.J., PEPPELENBOS, H.W., 1999: Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pear fruit by different mechanisms. *J. Exp. Bot.* 50: 837-844.
- DICK, A.J., BEARNE, S.L., 1988: Inhibition of β -galactosidase of apple by flavonoids and other polyphenols. *J. Food Biochem.* 12: 97-108.
- DICK, A.J., OPOKU-GYAMFUA, A., DE MARCO, A.C., 1990: Glycosidases of apple fruit: A multi-functional β -galactosidase. *Plant Physiol.* 80: 250-256.
- DIEHL, K.C., HAMANN, D.D., 1980: Relationships between sensory profile parameters and fundamental mechanical parameters for raw potatoes, melons and apples. *J. Text. Stud.* 10: 401-420.
- DOMINGUEZ-PUIGJANER, E., LLOP, I., VENDRELL, M., PRAT, S., 1997: A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiol.* 114: 1071-1076.
- FAN, X., BLANKENSHIP, S., MATTHEIS, J., 1999: 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 690-695.
- FAN, X., MATTHEIS, J.P., 1999: Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2847-2853.
- FAN, X., MATTHEIS, J.P., 2001: 1-Methylcyclopropene and storage temperature influence responses of 'Gala' apple fruit to gamma irradiation. *Posth. Biol. Technol.* 23: 143-151.
- FANESTIL, D.D., HASTINGS, A.B., MAHOWALD, J.A., 1963: Environmental CO₂ stimulation of mitochondrial adenosine triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 238: 836-842.
- FARKAS, V., SULOVA, Z., STRATILOVA, E., HANNA, R., MacLACHLAN, G., 1992: Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 365-370.
- FERGUSON, I.B., WATKINS, C.B., 1989: Bitter pit in apple fruit. *Hortic. Rev.* 11, 289-355.
- FISCHER, R.L., BENNETT, A.B., 1991: Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42: 675-703.
- FISCHER, M., 1993: Changes in the pectic substances during the ripening of apples. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- FORSYTH, F.R., EAVES, C.A., 1975: Ripening of apples in CA storage, low or high ethylene levels and medium or high humidity levels. In: *Facteurs et Regulation de la Maturation des Fruits*, 1974. Paris: Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique. 238: 67-72.
- FRENKEL, C., PATTERSON, M.E., 1973: Effect of carbon dioxide on activity of succinic dehydrogenase in 'Bartlett' pears during cold storage. *HortScience* 8: 395-396.
- FRIEDRICH, G., NEUMANN, D., VOGL, M., 1978: *Physiologie der Obstgehölze*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 2. Auflage.

- FRIEDRICH, G., FISCHER, M., 2000: Physiologische Grundlagen des Obstbaus. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 3. Auflage.
- FRY, S.C., SMITH, R.C., RENWICK, K.F., MARTIN, D.J., HODGE, S.K., MATTHEWS, K.J., 1992: Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J.* 282: 821-828.
- FRY, S.C., 1995: Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 497–520.
- GAFFE, J., TIEMAN, D.M., HANDA, A.K., 1994: Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. *Plant Physiol.* 105: 199–203.
- GAFFE, J., TIZNADO, M.E., HANDA, A.K., 1997: Characterization and functional expression of a ubiquitously expresses tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol.* 114: 1547–1556.
- GASPAR, Y., JOHNSON, K.L., MCKENNA, J.A., BASIC, A., SCHULTZ, C.J., 2001: The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.* 47: 161–176.
- GEIGENBERGER, P., 2003: Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 247–256.
- GILROY, S., READ, N.D., TREWAVAS, A.J., 1990: Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 246: 769-771.
- GIOVANNONI, J.J., DELLA PENNA, D., BENNETT, A.B., FISCHER, R.L., 1989: Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell* 1: 53–63.
- GLENN, G.M., REDDY, A.S.N., POOVAIAH, B.W., 1988: Effect of calcium on cell wall structure, protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. *Plant Cell Physiol.* 29: 565-572.
- GLENN, G.M., POOVAIAH, B.W., 1990: Calcium-mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in ‘Golden Delicious’ apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 962–968.
- GONZALEZ-BOSCH, C., BRUMMELL, D.A., BENNETT, A.B., 1996: Differential expression of two endo-1,4-P-glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit. *Plant Physiol.* 111: 1313-1319.
- GORNY, J.R., KADER, A.A., 1997: Low O₂ and elevated CO₂ atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 542-546.
- GOUJON, T., MINIC, Z., EI AMRANI, A., LEROUXEL, O., ALETTI, E., LAPIERRE, C., JOSELEAU, J.P., JOUANIN, L., 2003: At-BXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative β -xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *Plant J.* 33: 677-690.

- GOULAO, L.F., SANTOS, J., SOUSA, I., OLIVEIRA, C.M., 2007: Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Posth. Biol. Technol.* 43: 307–318.
- GOULAO, L.F., OLIVEIRA, C.M., 2008: Cell wall modifications during fruit ripening: When a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 4–25.
- GRANT, G.T., MORRIS, E.R., REES, D.A., SMITH, P.J.C., THOM, D., 1973: Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32: 195–198.
- GRIERSON, D., HAMILTON, A.J., BOUZAYEN, M., KÖCK, M., LYCETT, G.W., BARTON, S., 1992: Regulation of gene expression and ripening in transgenic tomatoes. In: J.L. WRAY, (Ed.), *Inducible Plant Proteins - their Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press: 155-174.
- GROSS, K.C., 1984: Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. *Physiol. Plant.* 62: 25–32.
- GROSS, K.C., SAMS, C.E., 1984: Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochem.* 23: 2457–2461.
- GUAN, J.F., FAN, X.C., DOU, S.J., ZHANG, J.S., LI, G.M., 2006: The Relationship between senescence and Ca²⁺-ATPase activity of microsomal membrane and lipid peroxidation in harvested peach fruit. *Agric. Sci. China* 5(8): 609-614.
- HADFIELD, K.A., BENNETT, A., 1998: Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiol.* 117: 337-343.
- HAGERMAN, A.E., AUSTIN, P.J., 1986: Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J. Agric. Food Chem.* 34: 440-444.
- HARADA, T., SUNAKO, T., WAKASA, Y., SOEJIMA, J., SATOH, T., NIIZEKI, M., 2000: An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (Md-ACS1) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101: 742-746.
- HARKER, F.R., HALLETT, I.C., 1994: Physiological and mechanical properties of kiwifruit tissue associated with texture change during cold storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119: 987-993.
- HARKER, F.R., REDGWELL, R. J., HALLETT, I.C., MURRAY, S.H., 1997: Texture of fresh fruit. *Hort. Rev.* 20: 121-224.
- HARKER, F.R., KUPFERMAN, E.M., MARIN, A., GUNSON, F. A. B., TRIGGS, C. M., 2008: Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Posth. Biol. Technol.* 50: 70-78.
- HARKETT, P.J., HULME, A.C., RHODES, M.J.C., WOOLTORTON, L.S.C., 1971: The threshold value for physiological action of ethylene on apple fruits. *J. Food Technol.* 6: 39-45.
- HARPSTER, M.H., DAWSON, D.M., NEVINS, D.J., DUNSMUIR, P., BRUMMELL, D.A., 2002: Constitutive over-expression of a ripening-related pepper endo-1,4-β-glucanase in

- transgenic tomato fruit does not increase xyloglucan depolymerization or fruit softening. *Plant Mol. Biol.* 50: 357-369.
- HARRIMANN, R.W., TIEMAN, D.M., HANDA, A.K., 1991: Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and never ripe tomato fruits. *Plant Physiol.* 97: 80-87.
- HATFIELD, R., NEVINS, D.J., 1986: Purification and properties of an endoglucanase isolated from the cell walls of *Zea mays* mais seedlings. *Carbohydr. Res.* 148: 265-278.
- HAYASHI, T., WONG, Y.S., MacLACHLAN, G., 1984: Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo-1,4- β -glucanases. *Plant Physiol* 75: 605–610.
- HECKE, K., HERBINGER, K., VEBERIC, R., M. STEFANIC, M., TOPLAK, H., STAMPAR, F., KEPPEL, H., GRILL, D., 2006: Sugar-, acid- and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 609: 1136–1140.
- HEWETT, E.W., THOMPSON, C.J., 1992: Modification of internal carbon dioxide and oxygen levels in apple fruit by postharvest calcium application and modified atmospheres. *Posth. Biol. Technol.* 1: 213–219.
- HIPPS, N.A., PERRING, M.A., 1989: Effects of soil management systems and nitrogen fertilizer on the firmness and mean fruit weight of Cox's Orange Pippin apples at harvest. *J. Sci. Food Agr.* 48: 507–510.
- HIWASA, K., NAKANO R., HASHIMOTO, A., MATSUZAKI, M., MURAYAMA, H., INABA, A., KUBO, Y., 2004: European, Chinese and Japanese pear fruits exhibit differential softening characteristics during ripening. *J. Exp. Bot.* 55: 2281-2290.
- HOBSON, G.E., 1962: Determination of polygalacturonase in fruits. *Nature* 195: 804–805.
- HÖHN, E., 2001: Fruchtfleischfestigkeit bei Tafeläpfeln: Marktanspruch, Erntezeitpunkt und Lagerung, *Schweiz. Z. Obst- Weinbau*, 15: 410-413.
- HÖHN, E., GASSER, F., GUGGENBÜHL, B., KÜNSCH, U., 2003: Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Posth. Biol. Technol.* 27: 27–37.
- HÖHN, E., BAUMGARTNER, D., GASSER, F., GABIOUD S., 2007: Ripening regulation and consumer expectations. *Acta Hort.* 796: 83-91.
- HUBER, D.J., 1983: Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108: 405-409.
- HUBER, D.J., O'DONOGHUE, E.M., 1993: Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant Physiol.* 102: 473-480.
- HUBER, D.J., JEONG, J., MAO, L.C., 2003: Softening during ripening of ethylene-treated fruits in response to 1-methylcyclopropene application. *Acta Hort.* 628: 193-202.

- ISHII, T., MATSUNGA, T., PELLERIN, T., O'NEILL, M.A., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P., 1999: The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 274: 13098-13104.
- ITAI, A., YOSHIDA K., TANABE, K., TAMURA, F., 1999: A β -D-xylosidase-like gene is expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J. Exp. Bot.* 50: 877-878.
- ITAI, A., ISHIHARA, K., 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.
- JARVIS, M.C., 1984: Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Envir.* 7: 153-164.
- JARVIS, M.C., BRIGGS, S.P.H., KNOX, J.P., 2003: Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant Cell Envir.* 26: 977-989.
- JENA, P.K., REDDY, A.S.N., POOVAIAH, B.W., 1989: Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin: signal-induced changes in the expression of calmodulin. *Proc Nat. Acad. Sci.* 86: 3644-3648.
- JEONG, J., HUBER, D.J., 2004: Suppression of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit softening, and changes in cell wall matrix polysaccharides and enzyme activities: Differential responses to 1-MCP and delayed ethylene application. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129: 752-759.
- JIANG, Y.M., JOYCE, D.C., 2002: 1-methylcyclo-propene treatment effects on intact and fresh-cut apple. *J. Hon. Sci. Biotechnol.* 77: 19-21.
- JIMENEZ-BERMUDEZ, S., REDONDO-NEVADO, J., MUNOZ-BLANCO, J., CABALLERO, J.L., LOPEZ-ARANDA, J.M., VALEPUESTA, V., PLIEGO- ALFARO, F., QUESADA, M.A., MERCADO, J.A., 2002: Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128: 751-759.
- JOHN, P., 1997: Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiol. Plant.* 100: 583-592.
- JOHNSTON, J.W., HEWETT, E.W., HERTOOG, M. L.A. T., HARKER, F.R., 2001: Temperature induces differential softening responses in apple cultivars. *Posth. Biol. Technol.* 23: 185-196.
- JOHNSTON, J.W., HEWETT, E.W., HERTOOG, M.L.A.T.M., 2002a: Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review. *NZ J. Crop Hortic. Sci.* 30: 145-160.
- JOHNSTON, J.W., HEWETT, E.W., HERTOOG, M.L.A.T., HARKER, F.R., 2002b: Temperature and ethylene affect induction of rapid softening in 'Granny Smith' and 'Pacific Rose™' apple cultivars. *Posth. Biol. Technol.* 25: 257-264.
- KADER, A.A., 1986: Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technol.* 40: 99-104.
- KADER, A.A., ZAGORY, D., KERBEL, E.L., 1989: Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 1-30.

- KADER, A.A., 2002: Fruits in the global market. In: M. KNEE (Ed.), Fruit Quality and its Biological Basis. Sheffield Academic Press, Sheffield: 1-14.
- KADER, A.A. (Ed.), 2007: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas, Postharvest Technology Research & Information Center University of California, Davis, Series de Horticultura Postcosecha No. 24. 3. Auflage.
- KANELLIS, A.K., SOLOMOS, T., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., 1991: Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes of avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. *Plant Physiol.* 96: 269-274.
- KANELLIS, A.K., LOULAKAKIS, K.A., HASSAN, M., ROUBELAKIS- ANGELAKIS, K.A., 1993: Biochemical and molecular aspects of low oxygen action on fruit ripening. In: C.J. Pech, A. Latche, C. Balague (Eds.), Cellular and Molecular Aspect of the Plant Hormone Ethylene. Kluwer Academic, Dordrecht: 117–122.
- KANELLIS, A.K., TONUTTI, P., PERATA, P., 2010: Biochemical and molecular aspects of modified and controlled atmospheres. In: E.M. YAHIA, (Ed.), Modified and controlled atmospheres for the storage, transportation, and packaging of horticultural commodities. CRC Press Boca Raton, London, New York: 553-567.
- KASAI, S., HAYAMA, H., KASHIMURA, Y., KUDO, S., OSANAI, Y., 2008: Relationship between fruit cracking and expression of the expansin gene MdEXPA3 in ‘Fuji’ apples (*Malus domestica* Borkh.). *Sci. Hortic.* 116: 194–198.
- KAYS, S., 1991: Postharvest physiology of perishable plant products. An AVI book. Van Nostrand Reinhold, New York.
- KE, D., MATEOS, M., SIRIPHANICH, J., LI, C., KADER, A.A., 1993: Carbon dioxide action on metabolism of organic and amino acids in crisphead lettuce. *Posth. Biol. Technol.* 3: 235-247.
- KE, D., YAHIA, E., MATEOS, M., Kader, A.A., 1994: Ethanolic fermentation of ‘Bartlett’ pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119: 976-982.
- KENDE, H., 1989: Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.* 91: 1–4.
- KENDE, H., 1993: Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283-307.
- KERBEL, E.L., Kader, A.A., ROMANI, R.J., 1990: Respiratory and glycolytic response of suspension-cultured ‘Passe Crassane’ pear fruit cells to elevated CO₂ concentrations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 111-114.
- KERTESZ, I., 1951: The pectic substances. New York: Interscience Publishers. New York City, New York.
- KHAN, A.A., VINCENT, J.F., 1990: Anisotropy of apple parenchyma. *J. Sci. Food Agr.* 52: 455-466.
- KIDD, F., WEST, C., 1925: The course of respiratory activity throughout the life of an apple. Great Britain Dept. Sci. Ind. Res. Food Invest. Rpt. 1924: 27-33.

- KIDD, F., WEST, C., WEST, M.N., 1927: Gas storage of fruit. Great Britain Dept. Sci. Ind. Res. Food Invest. Rpt. 1926: 1-87.
- KIDD, F., WEST, C., 1934: The influence of the composition of the atmosphere upon the incidence of the climacteric in apples. Great Britain Dept. Sci. Ind. Res. Food Invest. Rpt. 1933: 119-122.
- KLEE, H., TIEMAN, D., CIARDI, J., TAYLOR, M., 2003: Regulation of ethylene responses by control of receptor levels. In: M. Vendrell, H. Klee, J.C. Pech, F. Romojaro (Eds.), *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*. IOS Press: 193-197.
- KLEIN, J.D., HANZON, J., IRWIN, P.L., SHALOM, N.B., LURIA, S., 1995: Pectin esterase activity and pectin methyl esterification in heated Golden Delicious apples. *Phytochem.* 39: 491-494.
- KNEE, M., 1973: Effects of controlled atmosphere storage on respiratory metabolism of apple fruit tissue. *J. Sci. Food Agric.* 24: 1289-1298.
- KNEE, M. 1978: Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytochem.* 17: 1261-1264.
- KNEE, M., BARTLEY, I.M., 1981: Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening fruits. In: J. Friend, M.J.C. Rhodes (Eds.). *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Academic, New York, pp. 133-148.
- KNEE, M., 1982: Fruit softening. III. Requirement for oxygen and pH effects. *J. Exp. Bot.* 33: 1263-1269.
- KNEE, M., LOONEY, N.E., HATFIELD, S.G.S., SMITH, S.M., 1983: Initiation of rapid ethylene synthesis by apple and pear fruits in relation to storage temperature. *J. Expt. Bot.* 34: 1207-1212.
- KNEE, M.; SMITH, S. M., 1989: Variation in quality of apple fruits stored after harvest on different dates. *J. Hortic. Sci.* 64: 413-419.
- KNEE, M., 2002: *Fruit quality and its biological basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield
- KNIGHT, M.R., CAMPBELL, A.K., SMITH, S.M., TREWAVAS, A.J., 1991: Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 8: 524-526.
- KOCH, J.L., NEVINS, D.J., 1989: Tomato fruit cell wall: I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectin methylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiol.* 91: 816-822.
- KONNO, H., YAMAYA, T., YAMASAKI, Y., MATSUMOTO, H., 1984: Pectic polysaccharide breakdown of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation. *Plant Physiol.* 76: 633-637.
- KRAMER, M., SANDERS, R., BOLKAN, H., WATERS, C., SHEEHY, R.E., HIATT, W.R., 1992: Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: Processing, firmness and disease resistance. *Posth. Biol. Technol.* 1: 241-255.

- KUBO, Y., INABA, A., NAKAMURA, R., 1989: Effects of high CO₂ on respiration in various horticultural crops. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 58: 731-736.
- LANGLEY, K.R., MARTIN, A., STENNING, R., MURRAY, A.J., HOBSON, G.E., SCHUCH, W.W., BIRD, C.R., 1994: Mechanical and optical assessment of the ripening of tomato fruit with reduced polygalacturonase activity. *J. Sci. Food Agric.* 66: 547-554.
- LAPSLEY, K.G., ESCHER, F.E., HOEHN, E., 1992: The cellular structure of selected apple varieties. *Food Structure* 11: 339-349.
- LARA, I., Vendrell, M., 1998: ACC oxidase activation by cold storage on 'Passe-Crassane' pears: Effect of calcium treatment. *J. Sci. Food Agri.* 76: 421-426.
- LASHBROOK, C.C., GONZALEZ-BOSCH, C., BENNETT, A.B., 1994: Two divergent endo-P-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* 6: 1485-1493.
- LARRIGAUDIERE, C., GRAELL, J., SALAS, J., VENDRELL, M., 1997: Cultivar differences in the influence of a short period of cold storage on ethylene biosynthesis in apples. *Posth. Biol. Technol.* 10: 21-27.
- LEGGE, R.L., THOMPSON, J.E., BAKER, J.E., LIEBERMAN, M., 1982: The effect of calcium on the fluidity and phase properties of microsomal membranes isolated from postclimacteric Golden Delicious apples. *Plant Cell Physiol.* 23: 161-169.
- LEWIS, L.N., LINKINS, A.E., O'SULLIVAN, S., RELD, P.D., 1974: Two forms of cellulase in bean plants. *Proc. 8th Intern. Conf. Plant Growth Subst.* 708-718.
- LI, Z., LIU, Y., DONG, J., XU, R., ZHU, M., 1983: Effect of low oxygen and high carbon dioxide on the levels of ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits. *J. Plant Growth Regul.* 2: 81-87.
- LI, X., CAO, S., ZHENG, Y., SUN, A., 2011: 1-MCP suppresses ethylene biosynthesis and delays softening of 'Hami' melon during storage at ambient temperature. *J. Sci. Food Agric.* 91: 2684-2688.
- LIANG, Y.F., AO, L.D., WANG, M.X., YI, W.J., 1982: The role of polygalacturonase (PG) in the ripening of apple fruits. *Acta Bot. Sin.* 24: 143-146.
- LIEBERMAN, M., MAPSON, L.W., 1964: Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature* 204: 343-345.
- LIDSTER, P.D., McRAE, K.B., DICK, A.J. 1985: Effects of a vacuum infusion of a partially purified and galactosidase inhibitor on apple quality. *HortScience* 20: 80-82.
- LINK, H., 2002: `Lucas`Anleitung zum Obstbau. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 32. Auflage.
- LIU, H.X., JIANG, W.B., ZHOU, L.G., WANG, B.G., LUO, Y.B., 2005: The effects of methylcyclopropene on peach fruit (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) ripening and disease resistance. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 40: 1-7.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D., 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402-408.

- LOHANI, S., TRIVEDI, P.K., NATH, P. 2004: Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: Effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Posth. Biol. Technol.* 31: 119-126.
- LURIE, S., 2002: Temperature management. In: M. Knee (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*, Sheffield Academic Press, Sheffield: 107-121.
- LUTON, M.T., HOLLAND, D.A., 1986: The effect of pre-harvest factors on the quality of stored Conference pears. I. Effect of orchard factors. *J. Hort. Sci.* 61: 23-32.
- MAC LACHLAN, G., BRADY, C., 1992: Multiple forms of 1,4- β -glucanase in ripening tomato fruits include a xyloglucanase activatable by xyloglucan oligosaccharides. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 137-146.
- MAC LACHLAN, G., BRADY, C., 1994: Endo-1,4- β -glucanase, xyloglucanase, and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 105: 965-974.
- MALCOLM, G.L., 2005: Advancement in the implementation of CA technology for storage of perishable commodities. *Acta Hort.* 682: 1593-1597.
- MANN, H., BEDFORD, D., LUBY, J., VICKERS, Z., TONG, C., 2005: Relationship of instrumental and sensory texture measurements of fresh and stored apples to cell number and size. *HortScience* 40: 1815-1820.
- MARCELLE, R.D., 1991: Relationships between mineral content, lipoxygenase activity, levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene emission in apple fruit flesh disks (cv. Jonagold) during storage. *Posth. Biol. Technol.* 1: 101-109.
- MARIN-RODRIGUEZ, M.C., SMITH, D.L., MANNING, K., ORCHARD, J., SEYMOUR, G.B., 2003: Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol.* 51: 851-857.
- MARTINEZ, G.A., CHAVES, A.R., CIVELLO, P.M., 2004: β -Xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 89-96.
- MASSIOT, P., BARON, A., Drilleau, J.F., 1996: Effect of storage of apple on the enzymatic hydrolysis of cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 29: 301-307.
- MATHOOKO, F.M., 1996: Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Posth. Biol. Technol.* 7: 1-26.
- MATTHEIS, J.P., FAN X.T., ARGENTA, L.C., :2005: Interactive responses of Gala apple fruit volatile production to controlled atmosphere storage and chemical inhibition of ethylene action. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4510-4516.
- McATEE, P., HALLETT, I.C., JOHNSTON, J.W., SCHAFFER, R.J., 2009: A rapid method of fruit cell isolation for cell size and shape measurements. *Plant Methods.* 5: 5.
- McCANN, M.C., WELLS, B., ROBERTS, K., 1990: Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* 96: 323-334.
- McCORMICK, R., KITTEMANN, D., STREIF, J., 2008: Consumer preferences for 'Elstar' apples at different ripening stages treated with 1-MCP. *Acta Hort.* 858: 99-103.

- McKEON, T.A., FERNANDEZ-MACULET, J.C., YANG, S.F., 1995: Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht. Kluwer: 118-139.
- McQUEEN-MASON, S.J., DURACHKO, D.M., COSGROVE, D.J., 1992: Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.
- McQUEEN-MASON, S.J., COSGROVE, D.J., 1994: Disruption of hydrogen-bonding between plant-cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 6574-6578.
- McQUEEN-MASON, S.J., COSGROVE, D.J., 1995: Expansin mode of action on cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107: 87-100.
- MEDINA-ESCOBAR, N., CARDENAS, J., MOYANO, E., CABALLERO, J.L., MUNOZ-BLANCO, J., 1997: Cloning, molecular characterisation and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol. Biol.* 34: 867-877.
- MEDINA-SUAREZ, R., MANNING, K., FLETCHER, J., AKED, J., BIRD, C.R., SEYMOUR, G.B., 1997: Gene expression in the pulp of ripening bananas. *Plant Physiol.* 115: 453-461.
- METZIDAKIS, J., SFAKIOTAKIS, E., 1993: Inhibition of ethylene biosynthesis and suppression of cellulase and polygalacturonase in avocado fruit subjected to low oxygen storage. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 129-135.
- MIR, N., BEAUDRY, R., 2002: Atmosphere control using oxygen and carbon dioxide. In: M. KNEE (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield: 122-149.
- MITCHELL, F.G., 1992: Cooling horticultural commodities: The need for cooling. In: A.A. Kader (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Univ. Calif. Agric. Nat. Res. Pub. 3311: 53-63.
- MOHR, H., SCHOPFER, P., 1992: *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 4. Auflage.
- MONNING, A., 1983: Studies on the reaction of Krebs cycle enzymes from apple tissue (cv Cox Orange) to increased levels of CO₂. *Acta Hort.* 138: 113-119.
- MWANIKI, M.W., MATOOKO, F.M., HIWASA, K., TATEISHI, A., USHIJIMA, K., NAKANO, R., KUBO, Y., INABA, A., 2007: β -galactosidase and α -L-arabinofuranosidase activities and gene expression in European and Chinese pear fruit during ripening. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 76: 85-90.
- NAKAMURA, S., HAYASHI, T., 1993: Purification and properties of an extracellular endo-1,4- β -glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant Cell Physiol.* 34: 1009-1013.
- NAKATSUKA, A., MARURO, T., ISHIBASHI, C., UEDA, Y., KOBAYASHI, N., YAMAGISHI, M., ITAMURA, H., 2011: Expression of genes encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase in 'Saijo' persimmon fruit during softening after deastringency treatment. *Posth. Biol. Technol.* 62: 89-92.

- NARA, K., KATO, Y., Motomura, Y., 2001: Involvement of terminal-arabinose and -galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage. *Posth. Biol. Technol.* 22: 141-150.
- NIKOLIC, M.V., MOJOVIC, L., 2007: Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes. *Food Chem.* 101: 1-9.
- NISHITANI, K., TOMINAGA, R., 1992: Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 267: 21058-21064.
- OELLER, P.W., WONG, L.M., TAYLOR, L.P., PIKE, D.A., THEOLOGIS, A., 1991: Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439.
- OHMIYA, K., SAKKA, K., KARITA, S., KIMURA, T., 1997: Structure of cellulases and their applications. *Biotechnol. Genet. Rev.* 14: 365-414.
- O'Neill, M.A., ISHII, T., Albersheim P., Darvill A.G., 2004: Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 109-139.
- ORTIZ, A., LARA, I., 2008: Cell wall modifying enzyme activities after storage of 1-MCP treated peach fruit. *Acta Hortic.* 796: 137-142.
- ORTIZ, A., ECHEVERRIA, G., GRAELL, J., LARA, I., 2010: Cell wall-modifying enzyme activities after controlled atmosphere storage of calcium-treated 'Fuji' apples. *Acta Hortic.* 858: 213-216.
- ORTIZ, A., GRAELL, J., LARA, I., 2011: 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.
- PALIATH, G., POOVAIAH, B.W., MUSKE, G.R., MAGNUSON, J.A., 1984: membrane fluidity in senescing apples: Effects of temperature and calcium. *Plant Cell Physiol.* 25: 1081-1083.
- PATHAK, N., SANWALL, G. G., 1998: Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. *Phytochem.* 48: 249-255.
- PAULL, R.E., GROSS, K.QIU, Y., 1999: Changes in papaya cell walls during fruit ripening. *Posth. Biol. Technol.* 16: 79-89.
- PAYASI, A., SANWAL, G.G., 2003: Pectate lyase activity during ripening of banana fruit. *Phytochem.* 63, 243-248.
- PAYASI, A., MISRA, P.C., SANWAL, G.G., 2004: Effect of phytohormones on pectate lyase activity in ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 861-865.
- PENA, M., CARPITA, N. C., 2004: Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiol.* 135: 1305-1313.
- PERATA, P., Alpi, A., 1993: Plant responses to anaerobiosis, *Plant Sci.* 93: 1-17.

- PERCY, A.E., O'BRIEN, I.E.W., JAMESON, P.E., MELTON, L.D., MacRAE, E.A., REDGWELL, R.J. 1996: Xyloglucan endotransglycosylase activity during fruit development and ripening of apple and kiwifruit. *Physiol. Plant.* 96: 43-50.
- PERCY, A.E., MELTON, L.D., JAMESON, P.E., 1997: Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. *Plant Sci.* 125: 31-39.
- PHAN. T.D., BO, W., WEST, G., LYCETT, G.W., TUCKER, G.A., 2007: Silencing of the major salt-dependent isoform of pectin esterase in tomato alters fruit softening. *Plant Physiol.* 144: 1960-1967.
- PHARR, D.M., SOX, H.N., NESBITT, W.B., 1976: Cell wall bound nitrophenylglycosides of tomato fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 397-400.
- PICCHIONI, G.A., WATADA, A.E., CONWAY, W.S., WHITAKER, B.D., SAMS, C.E., 1998: Postharvest calcium infiltration delays membrane lipid catabolism in apple fruit. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2452-2457.
- PILNIK, W., VORAGEN, D.J., 1970: Pectic substances and other uronides. In: A.C. Hulme (Ed.). *The Biochemistry of Fruits and their Products.* Academic Press, New York. pp. 53-87.
- PITT, R.E., CHEN, H.L., 1983: Time-dependent aspects of the strength and rheology of vegetative tissue. *Transact. Amer. Soc. Agric. Engineering* 26: 1275-1280.
- POOVAIAH, B.W.. 1985. Role of calcium and calmodulin in plant growth and development. *Hort. Sci.* 20: 347-352.
- POOVAIAH, B.W., REDDY, A.S.N., 1987: Calcium messenger system in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 47-103.
- POOVAIAH, B.W., GLENN, G.M., REDDY, A.S.N., 1988: Calcium and fruit softening: Physiology and biochemistry. *Hortic. Rev.* 10: 107-152.
- POOVAIAH, B.W., 1993: Biochemical and molecular aspects of calcium action. *Acta Hortic.* 326: 139-47.
- Popper, Z.A. Fry, S.C., 2005: Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Annals Bot.* 96: 91-99.
- PRANGE, R.K., DELONG, J.M., 2003: Methylcyclopropene: The "magic bullet" for horticultural products? *Chronica Hortic.* 43: 11-14.
- PRESSEY, R., AVANTS, J.K., 1972: Multiple forms of pectin esterase in tomatoes. *Phytochem.* 11: 3139-3142.
- PRESSEY, R., AVANTS, J.K., 1982: Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonase: effects of pectin methylesterase. *J. Food Biochem.* 6: 57-74.
- RAESE, J.T., Drake., S.R., 1993: Effects of preharvest calcium sprays on apple and pear quality. *J. Plant Nutr.* 16: 1807-1819.
- RANSON, S.L., WALKER, D.A., CLARKE, I.D., 1960: Effects of carbon dioxide on mitochondrial enzymes from *Ricinus*. *Biochem. J.* 76: 216-221.

- RAJAPAKSE, N.C., HEWETT, E.W., Banks, N., CLELAND, D.J., 1992: Vacuum infiltration with Ca chloride influences oxygen distribution in apple flesh. *Posth. Biol. Technol.* 1: 221-229.
- REDGWELL, R.J., MELTON, L.D., BRASCH, D.J., 1992: Cell wall dissolution in ripening kiwifruit: solubilization of pectic polymers. *Plant Physiol.* 98: 71-81.
- REDGWELL, R.J., FRY, S.C., 1993: Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening. *Plant Physiol* 103: 1399-1406.
- REDGWELL, R.J., FISCHER, M., KENDAL, E., MACRAE, E.A., 1997a: Galactose loss and fruit ripening: High-molecular-weight arabinogalactans in the pectin polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203: 174-181.
- REDGWELL, R.J., MacRAE, E., HALLETT, I., FISCHER, M., PERRY, J., HARKER, R., 1997b: In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162-173.
- REDGWELL, R.J., FISCHER, M., 2002: Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In: M. Knee (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*, Sheffield Academic Press, Sheffield: 46-88.
- REID, M. S., WOLLENWEBER, B., SEREK, M., 2002: Carbon balance and ethylene in the postharvest life of flowering hibiscus. *Posth. Biol. Technol* 25: 227-233.
- REXOVA-BENKOVA, L., MARKOVIC, O., 1976: Pectic Enzymes. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, New York: 323-385.
- RODRIGUEZ, F.I., ESCH, J.J., HALL, A.E., BINDER, B.M., SCHALLER, G.E., BLEECKER, A.B., 1999: A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996-998.
- ROMO-PARADA, L., WILLEMOTT, C., CASTAIGNE, F., GOSSELIN, C., ARUL, J., 1989: Effects of controlled atmospheres (low oxygen, high carbon dioxide) on storage of cauliflower (*Brassica oleracea* L., Botrytis Group). *J. Food Sci.* 54: 122-124.
- RONEN, R., ZAUBERMAN, G., AKERMAN, M., WEKSLER, A., ROT, I., FUCHS, Y., 1991: Xylanase and xylosidase activities in avocado fruits. *Plant Physiol.* 95: 961-964.
- ROSE, J.K.C., LEE, H.H., BENNETT, A.B., 1997: Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 5955-5960.
- ROSE, J.C., BENNETT, A.B., 1999: Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4: 176-183.
- ROSLI, H.G., PEDRO, M., CIVELLO, A., MARTINEZ, G., 2009: α -L-arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 272-281.
- ROSS, G.S., REDGWELL, R.J., MacRAE, E.A., 1993: Kiwifruit β -galactosidase: isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. *Planta* 189: 499-506.

- ROSS, G.S., WAGRZYN, T., MacRAE, E.A., REDGWELL, R.J., 1994: Apple β -galactosidase: activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 106: 521-528.
- RUPASINGHE, H.P.V., MURR, D.P., PALIYATH, G., SKOG, L., 2000: Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in 'McIntosh' and 'Delicious' apples. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 75: 271-276.
- RUPERTI, B., CATTIVELLI, L., PAGNI, S., RAMINA, A., 2002: Ethylene responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *J. Exp. Bot.* 53: 429-437.
- RYDEN, P., SUGIMOTO-SHIRASU, K., SMITH, A.C., FINDLAY, K., REITER, W.D., McCANN, M.C., 2003: Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.* 132: 1033-1040.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- SAMS, C. E., CONWAY, W. S., 1984: Effect of calcium infiltration on ethylene production, respiration rate, soluble polyuronide content, and quality of 'Golden Delicious' apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 53-57.
- SAMS, C. E., 1999: Preharvest factors affecting postharvest texture. *Posth. Biol. Technol.* 15: 249-254.
- SAQUET, A.A., STREIF, J., BANGERTH, F., 2003: Impaired aroma production of CA-stored 'Jonagold' apples as affected by adenine and pyridine nucleotide levels and fatty acid concentrations. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78: 695-705.
- SCHUCH, W., KANCZLER, J., ROBERTSON, D., HOBSON, G., TUCKER, G., GRIERSON, D., BRIGHT, S., BIRD, C., 1991: Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortScience* 26: 1517-1520.
- SCHRÖDER, R., WEGRZYN, T.F., BOLITHO, K.M., REDGWELL, R.J., 2004: Mannan transglycosylase: A novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta* 219: 590-600.
- SHACKEL, K.A., GREVE, C., LABAVITCH, J.M., AHMADI, H., 1991: Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiol.* 97: 814-816.
- SELVENDRAN, R.R., 1985: Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J. Cell Sci. Suppl.* 2: 51-88.
- SEXTON, R., JANE, M., PALMER, N., SUSAN, L., 1997: Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. Glenn Clova). *Ann. Bot.* 80: 371-376.
- SEYMOUR, G.B., LASSLETT, Y., TUCKER, G.A., 1987: Differential effects of pectolytic enzymes on tomato polyuronides in vivo and in vitro. *Phytochem.* 26: 3137-3139.
- SEYMOUR, G.B., COLQUHOUN, I.J., DuPONT, M.S., PARSLEY, K.R., SELVENDRAN, R.R., 1990: Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochem.* 29: 725-731.

- SEYMOUR, G.B., MANNING, K., 2002: Genetic control of fruit ripening. In: M. Knee (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield: 253-274.
- SHEEHY, R.E., KRAMER, M., HIATT, W.R., 1988: Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 8805-8809.
- SHIPWAY, M.R., BRAMLAGE, W.J., 1973: Effects of carbon dioxide on activity of apple mitochondria. *Plant Physiol.* 51: 1095-1098.
- SIDDIQUI, S., BANGERTH, F., 1993: Studies on cell wall mediated changes during storage of calcium-infiltrated apples. *Acta Hort.* 326: 105-113.
- SIDDIQUI, S., BANGERTH, F. 1996: The effect of calcium infiltration on structural changes in cell walls of stored apples. *J. Hortic. Sci.* 71: 703-708.
- SIDDIQUI, S., BRACKMANN, A., STREIF, J., BANGERTH, F., 1996: Controlled atmosphere storage of apples. Cell wall composition and fruit softening. *J. Hortic. Sci.* 71: 613-620.
- SIDDIQUI, S., STREIF, J., BANGERTH, F., 2004: Apple fruit softening under controlled atmosphere: The potential role of cell wall enzymes. *J. Food, Agric. Environ.* 2: 205-2008.
- SISLER, E.C., BLANKENSHIP, S.M., 1996: Method of counteracting an ethylene response in plants. U.S. Patent 5518988.
- SITRIT, Y., BENNETT, A.B., 1998: Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: A re-examination. *Plant Physiol.* 116: 1145-1150.
- SMITH, C.J.S., WATSON, C.F., RAY, J., BIRD, C.R., MORRIS, P.C., SCHUCH, W., GRIERSON, D., 1988: Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334: 724-726.
- SMITH, D.L., FRY, S.C., 1991: Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem. J.* 279: 529-535.
- SMITH, D.L., STARETT, D.A., GROSS, K.C., 1998: A gene coding for tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiol.* 117: 417-423.
- SMITH, D.L., ABBOTT, J.A., GROSS, K.C., 2002: Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol.* 129: 1755-1762.
- SOLOMOS, T., 1982: Effects of low oxygen concentration on fruit respiration: Nature of respiratory diminution. In: D.G. Richardson. M. Meheriuk (Eds.), *Controlled Atmosphere for Storage and Transport of Perishable Agricultural Commodities*. Beaverton, Timber Press, pp. 171-178.
- SOLOMOS, T., 1987: Principles of gas exchange in bulky plant tissues. *HortScience* 22: 766-771.
- SOLOMOS, T., 2000: Interactions between oxygen concentration and climacteric onset of oxygen evolution. *Plant Growth Regl. Abstracts.* 26: 149.
- SOMMER, N.F., 1985: Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 7: 331-339.

- SONG, J., BANGERTH, F., 1993: The effect of calcium-infiltration on respiration, ethylene and aroma production of 'Golden Delicious' apple fruits. *Acta Hortic.* 326: 131-137.
- SOZZI, G.O., FRASCHINA, A.A., NAVARRO, A.A., CASCONI, O., GREVE, L.C., LABAVITCH, J.M., 2002: α -L-arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. *HortScience* 37: 564-566.
- STOW, J. 1993: Effect of calcium ions on apple fruit softening during storage and ripening. *Posth. Biol. Technol.* 3: 1-9.
- STOW, J.R., DOVER, C.J., GENGE, P.M., 2000: Control of ethylene biosynthesis and softening in 'Cox's Orange Pippin' apples during low-ethylene, low-oxygen storage. *Posth. Biol. Technol.* 18: 215-225.
- STREIF, J., 1978: Wirkung von Ethylen auf die Fruchtreife von Äpfeln im CA-Lager. *Gartenbauwissenschaft* 43: 54-58.
- STREIF, J., 1983. Der optimale Erntetermin beim Apfel. I. Qualitätsentwicklung und Reife. *Gartenbauwissenschaft* 48:154-159.
- STREIF, J., 2002: Ernte, Lagerung, Sortierung und Verpackung. In: H. Link (Ed.) *Lucas' Anleitung zum Obstbau*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 32. Auflage.
- STREIF, J., 2008: Ripening management and postharvest fruit quality. *Acta Hortic.* 858: 121-129.
- STREIF, J., KITTEMANN, D., NEUWALD, D.A., McCORMICK, R., XUAN, H., 2010: Pre- and post-harvest management of fruit quality, ripening, and senescence. *Acta Hort.* 877: 55-68.
- STOLL, K., 1997: *Der Apfel*, Enrico Negri AG, Zürich.
- STRASBURGER, E., NOLL, H., SCHENK, H., SCHIMPER, A.F.W., 1978: *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 31. Auflage (neubearbeitet von Denffer, D., Ehrendorfer, F., Mägdefrau, K., Ziegler, H.).
- TAIZ, L., ZEIGER, E., 2007: *Plant Physiology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 4. Auflage.
- TATEISHI, A., KANAYAMA, Y., YAMAKI, S., 1996: α -L-arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochem.* 42: 295-299.
- TATEISHI, A., MORI, H., WATARI, J., NAGASHIMA, K., YAMAKI, S., INOUE, H., 2005: Isolation, characterization, and cloning of α -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese pear. *Plant Physiol.* 138: 1653-1664.
- TATEISHI, A., 2008: β -galactosidase and α -L-arabinofuranosidase in cell wall modification related with fruit development and softening. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 77: 329-340.
- TATSUKI, M., ENDO, A., 2006: Analyses of expression patterns of ethylene receptor genes in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit treated with or without 1-methylcyclopropene (1-MCP). *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 75: 481-487.

- TIEMAN, D.M., HARRIMAN, R.W., RAMAMOCHAN, G., HANDA, A.K., 1992: An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* 4: 667-679.
- TIEMAN, D.M., HANDA, A.K., 1994: Pectin methylesterase regulates cation levels and tissue integrity in ripening tomato fruits. *Plant Physiol.* 106: 429-436.
- TONG, C., KRUEGER, D., VICKERS, Z., BEDFORD, D., LUBY, J., EL SHIEKH, A., SHACKEL, K., AHMADI, H., 1999: Comparison of softening-related changes during storage of 'Honeycrisp' apple, its parents, and 'Delicious.' *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 407-415.
- TRAINOTTI, L., ZANIN, D., CASSADORO, G., 2003: A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening of peaches. *J. Exp. Bot.* 54: 1821-1832.
- TRENTHAM, R.W., SAMS, C.E., CONWAY, W.S., 2008: Histological effects of calcium chloride in stored apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 487-491.
- TUCKER, G.A., ROBERTSON, N.G., GRIERSON, D., 1980: Changes in polygalacturonase isoenzymes during the "ripening" of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.* 112, 119-124.
- TUCKER, G.A., ROBERTSON, N.G., GRIERSON, D., 1982: Purification and changes in activities of tomato pectinesterase isoenzymes. *J. Sci. Food Agric.* 33: 396-400.
- TURNER, J.F., TURNER, D.H., 1975: The regulation of carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 159-189.
- VILLAREAL, N.M., BUSTAMANTE, C.A., CIVELLO, P.M., MARTINEZ, G.A., 2010: Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *J. Sci. Food Agric.* 90: 683-689.
- VICENTE, A. R., COSTA, M.L., MARTINEZ, G.A., CHAVES, A.R., CIVELLO, P.M., 2005: Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Posth. Biol. Technol.* 38: 213-222.
- VINCKEN, J.P., ZABOTINA, O.A., BELDMAN, G., VORAGEN, A.G.J., 1998: Xyloglucan endotransglycosylase activity in apples is ripening-related: Implications for fruit juice processing. *J. Sci. Food Agric.* 78: 46-52.
- VINCKEN, J.P., SCHOLS, H.A., OOMEN, R.J., McCANN, M.C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A.G., VISSER, R.G., 2003: If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132: 1781-1789.
- WÄCHTERSCHÄUSER, G., 2003: From pre-cells to Eukarya—a tale of two lipids. *Mol. Microbiol.* 47: 13-22.
- WALDRON, K.W., SMITH, A.C., PARR, A.J., NG, A., PARKER, M.L., 1997: New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 213-221.
- WALLNER, S.J., 1978: Apple fruit β -galactosidase and softening in storage. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103: 364-366.

- WAKABAYASHI, K., CHUN, J.-P., HUBER, D.J., 2000: Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (*Persea americana*) ripening involves concerted action of polygalacturonase and pectinmethylesterase. *Physiol. Plant.* 108: 345-352.
- WAKASA, Y., HATSUYAMA, Y., TAKAHASHI, A., SATO, T., NIIZEKI, M., HARADA, T., 2003: Divergent expression of six expansin genes during apple fruit ontogeny. *Europ. J. Hort. Sci.* 68: 253-259.
- WAKASA, Y., KUDO, H., ISHIKAWA R., AKADA, S., SENDA, M., NIIZEKI, M., HARADA, T., 2006: Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Posth. Biol. Technol.* 39: 193-198.
- WATKINS, C.B., NOCK, J.F., WHITAKER, B.D., 2000: Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methyl-cyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Posth. Biol.* 19: 17-32.
- WATKINS, C.B., 2002: Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In: M. Knee (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield: 180-207.
- WATKINS, C.B., MILLER, W.B., 2005: 1-Methylcyclopropene (1-MCP) based technologies for storage and shelf-life extension. *Acta Hortic.* 687: 201-207.
- WATKINS, C.B., 2006: The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* 24: 389-409.
- WEI, J., FENGWANG, M., SHOUGUO, S., XIUDONG, Q., XIANGQIU, Z., JUNWWI, Y., 2010: Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Posth. Biol. Technol.* 56: 147-154.
- WHITNEY, S.E.C., GIDLEY, M.J., McQUEEN-MASON, S.J., 2000: Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant J.* 22: 327-334.
- WILLIAMSON, R.E., ASHLEY, C.C., 1982: Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* 296: 647-651.
- WU, Q., SZAKACS-DOBOZI, M., HEMMAT, M., HRAZDINA, G., 1993: Endopolygalacturonase in apples (*Malus domestica*) and its expression during fruit ripening. *Plant Physiol.* 102: 219-225.
- XU, C.G., NAKATSUKA, A., KANO H., ITAMURA, H., 2003: Changes in ethylene production and activities of cell wall degrading enzymes during rapid fruit softening of Japanese persimmon 'Saijo'. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 72: 460-462.
- XUAN, H., STREIF, J., 2005: Effect of 1-MCP on the respiration and ethylene production as well as on the formation of aroma volatiles in 'Jonagold' apple during the storage. *Acta Hortic.* 682: 1203-1210.
- YAHIA, E.M., 2010: *Modified and controlled atmospheres for the storage, transportation, and packaging of horticultural commodities*. CRC Press Boca Raton, London, New York.

- YANG, S.F., HOFFMANN, N.E., 1984: Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- YANG, T., POOVAIAH, B.W., 2003: Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* 8: 505-512.
- YOSHIOKA, H., AOBA, K., KASHIMURA, Y., 1992: Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 600-606.
- YOSHIOKA, H., KASHIMURA, Y., KANEKO, K., 1994: Solubilization and distribution of neutral sugar residues derived from polyuronides during the softening in apple fruit. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 63: 173-182.
- YOSHIOKA, H., KASHIMURA, Y., KANEKO, K., 1995: β -D-galactosidase and α -L-arabinofuranosidase activities during the softening of apples. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 63: 871-878.
- YOUNES, A., STREIF, J., 2005: Effect of 1-MCP on the quality of 'Conference' pears. *Proc. Intern. Conf. Posth. Technol. Quality Management in Arid Tropics*: 315-318.
- ZANELLA, A., 2003: Control of apple superficial scald and ripening - a comparison between 1-methylcyclopropene and diphenylamine postharvest treatments, initial low oxygen stress and ultra low oxygen storage. *Posth. Biol. Technol.* 27: 69-78.
- ZYKWINSKA, A., RALET, M.C., GARNIER, C., THIBAUT, J.F. 2005: Evidence for in vitro binding of pectic side chains to cellulose. *Plant Physiol.* 139: 397-407.