

Schriften zu Genetischen Ressourcen

Schriftenreihe der Zentralstelle für Agrardokumentation und -information
Informationszentrum für Genetische Ressourcen (IGR)

Band 14

Regeneration adulter *Malus*-Unterlagen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum horticularum
vorgelegt der Humboldt-Universität Berlin
Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät

von Dipl.-Ing. agr.
Britta Feuerhahn
Berlin

Berlin, im Juli 2000

Gutachter:

1. Prof. Dr. sc. H.-H. Jesch (Humboldt-Universität Berlin)
2. Prof. Dr. agr. Sc. M. Fischer (Genbank Obst, Dresden-Pillnitz)

Dissertationskolloquium: 20. Juni 2000

Herausgeber:

Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI)
Informationszentrum für Genetische Ressourcen (IGR)
Villichgasse 17, D – 53177 Bonn
Postfach 20 14 15, D – 53144 Bonn
Tel.: (0228) 95 48 - 202
Fax: (0228) 95 48 - 220
Email: igr@zadi.de

Druck:

Druckerei Martin Roesberg
Geltorfstr. 52
53347 Alfter-Witterschlick

Schutzgebühr 20,- DM

ISSN 0948-8332

© ZADI Bonn, 2000

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Verzeichnis der Abkürzungen	iv
Zusammenfassung.....	vi
1 Einleitung.....	1
2 Zielstellung.....	6
3 Literaturübersicht	7
3.1 Konventionelle Verfahren zur Regeneration.....	7
3.2 <i>In-vitro</i> -Verfahren zur Regeneration.....	12
3.3 Möglichkeiten zur Bewertung der regenerierten Unterlagen	18
4 Material und Methoden.....	20
4.1 Konventionelle Verfahren zur Regeneration.....	20
4.1.1 Wurzelschnittlinge	20
4.1.2 Veredlungen.....	24
4.1.3 Verletzung der Baumwurzeln.....	25
4.1.4 Stecklinge	26
4.2 <i>In-vitro</i> -Verfahren zur Regeneration.....	27
4.2.1 Wurzelstücke	27
4.2.2 Kallusstücke	30
4.2.3 Sprosse	31
4.2.3.1 Etablierung.....	31
4.2.3.2 Vermehrung	32
4.2.3.3 Bewurzelung und Akklimatisation.....	33
4.2.4 Blattsegmente	34
4.3 Bewertung der regenerierten Unterlagen.....	35
4.3.1 Morphologische Untersuchungen.....	35
4.3.2 Molekulargenetische Untersuchungen.....	36
4.3.2.1 DNA-Isolierung.....	37
4.3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
4.3.2.3 DNA-Vervielfältigung	40
4.3.2.4 Gelelektrophorese.....	41
4.3.3 Virustestung.....	42

5 Ergebnisse.....	44
5.1 Konventionelle Verfahren zur Regeneration.....	44
5.1.1 Wurzelschnittlinge	44
5.1.2 Veredlungen.....	53
5.1.3 Verletzung der Baumwurzeln.....	56
5.1.4 Stecklinge	57
5.2 <i>In-vitro</i> -Verfahren zur Regeneration.....	59
5.2.1 Wurzelstücke	59
5.2.2 Kallusstücke	60
5.2.3 Sprosse	60
5.2.3.1 Etablierung.....	60
5.2.3.2 Vermehrung	62
5.2.3.3 Bewurzelung	64
5.2.3.4 Akklimatisation	69
5.3.4 Blattsegmente	71
5.3 Bewertung der regenerierten Unterlagen.....	72
5.3.1 Morphologische Untersuchungen.....	72
5.3.1.1 Blattform.....	73
5.3.1.2 Blattspitze	74
5.3.1.3 Blattrand	75
5.3.1.4 Drüsen am Blattrand.....	75
5.3.1.5 Behaarung	76
5.3.1.6 Nebenblätter.....	76
5.3.2 Molekulargenetische Untersuchungen.....	76
5.3.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	76
5.3.2.2 Gelelektrophorese 1996.....	78
5.3.2.3 Gelelektrophorese 1997.....	79
5.3.2.4 Gelelektrophorese 1998.....	80
5.3.3 Virustestung.....	83
5.4 Pflanzenbestand 1998	83
6 Diskussion	87
6.1 Die Bewertung der Vermehrung über Wurzelschnittlinge für die Regeneration adulter Unterlagen	88
6.2 Die Bewertung von Veredlungen für die Regeneration adulter Unterlagen.....	92
6.3 Die Bewertung der Verletzung der Baumwurzeln für die Regeneration adulter Unterlagen.....	95
6.4 Die Bewertung der Stecklingsvermehrung für die Regeneration adulter Unterlagen.....	95

6.5 Auswahl geeigneter Explantate für <i>In-vitro</i> -Verfahren zur Regeneration adulter Unterlagen	97
6.6 Möglichkeiten zur Bewertung der regenerierten Unterlagen	106
7 Schlußfolgerungen und Empfehlungen.....	113
7.1 Weiterverwendung der regenerierten Unterlagen	113
7.2 Vorschläge für ergänzende Untersuchungen.....	115
7.3 Vorgehensweise bei Versuchen zur Regeneration	117
adulter Unterlagen	
8 Zusammenfassung.....	120
9 Literaturverzeichnis	123
Anhang.....	A 1
Verzeichnis der Definitionen	
Verzeichnis der Tabellen	
Verzeichnis der Abbildungen	

Verzeichnis der Abkürzungen

2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure
Akk	Akklimatisationzeitraum
ApMV	Apple Mosaic Virus (Apfelmosaik-Virus)
BAP	6-Benzylaminopurine
BdB	Bund deutscher Baumschulen
BML	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
BWR	Bewurzelungsrate
BZ	Bodenzahl
CAC	Conformitas Agraria Communitas
CLSV	Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (Chlorotischer Apfelblatflecken-Virus)
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigacid
ELISA	Enzyme linked immunosorbend assay
EM	East Malling
GA ₃	Gibberellinsäure
HgCl ₂	Quecksilberchlorid
IBS	Indolyn-3-Buttersäure
LS	Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) in EDWIN et al. (1987)
M	Malling
MM	Malling-Merton
mA	mit Alkoholvorbehandlung
Min.	Minuten
MS	Medium nach MUSRASHIGE und SKOOG (1962)
N6	Medium nach CHU et al. (1975) in EDWIN et al. (1987)
oA	ohne Alkoholvorbehandlung
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rLF	relative Luftfeuchte
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RR	Regenerationsrate
RSA	Rinderserumalbum
SDS	Sodium dodecyl sulphat

Sek.	Sekunden
SGV	Apple Stem Grooving Virus (Apfelstammfurchungs-Virus)
TDZ	Thidiazuron
ÜWR	Überwinterungsrate
UL	Unterlage(n)
VVO	Virus-Verordnung Obst
WPM	Woody-Plant-Medium

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regenerationsmöglichkeit adulter *Malus*-Unterlagen nachgewiesen. Mit Hilfe verschiedener konventioneller und *In-vitro*-Verfahren gelang es acht verschiedenen *Malus*-Unterlagen zu regenerieren, die aus einer Pflanzung von 1804 stammen. Die ausgewählten Verfahren wurden auf ihre Anwendbarkeit für eine Regeneration adulter Unterlagen getestet und gegebenenfalls optimiert. Es erfolgte eine morphologische und molekulargenetische Untersuchung der regenerierten Unterlagen außerdem ein Test auf ihren Virusstatus. Sie wurden zudem als Ausgangsmaterial für weitere Vermehrungsversuche verwendet. Zum Abschluß der Arbeit wird ein Verfahren zur Regeneration adulter Unterlagen vorgeschlagen.

Summary

The experiments showed that it was possible to regenerate adult *Malus*-rootstocks. The chosen trees were planted in 1804. The regeneration of eight different *Malus*-rootstock succeeded with different conventional and *in vitro* methods. The selected methods were tested for their availability for regeneration adult rootstocks. With morphological characters and molecular-genetical methods the regenerated rootstocks were examined and a test of virus infection was carried out. The regenerated rootstocks served as basis for other propagation methods. At the end of this paper it will be given a recommendation for a procedure to regenerate adult rootstocks.

1 Einleitung

Durch den zunehmenden Verlust der genetischen Vielfalt wird die Erhaltung genetischer Ressourcen immer wichtiger. Über Jahrtausende wurden Kulturarten und -sorten geschaffen und erhalten. In den vergangenen Jahren wurde durch die starke und überregionale Verbreitung von Handelssorten die Anzahl sogenannter Land- und Lokalsorten stark zurückgedrängt (HELLER 1996). Jedoch sollte auf die ursprünglichen Landrassen nicht verzichtet werden, da die neuen Sorten auf Grund ihrer geringen Lebenserwartung für die Nutzung im Streuobstanbau und für die Nutzung in der freien Landschaft ausscheiden.

Von 1994 bis 1998 wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes¹ im Land Brandenburg verstärkt die Erhaltung von Streuobstanlagen mit alten Lokalsorten unterstützt. Als Wegbegleitpflanzen kommen in diesem Gebiet zahlreiche extensiv genutzte Obstbestände vor. Die vorhandenen alten Obstbäume sollen als genetische Ressourcen an ihrem natürlichen Standort erhalten bzw. an weiteren etabliert werden. Der Schwerpunkt wurde auf die genetische Ressource des Apfels gelegt. Die Erhaltung der Bestände ist außerordentlich wichtig, da sie durch infrastrukturelle Maßnahmen in ihrer Existenz bedroht sind.

Im Rahmen des Projektes wurden im Jahr 1996 repräsentative und besonders vitale Obstgehölze der Gattung *Malus* ausgewählt. Auf Grund ihres hohen Alters [Pflanzung 1804, HARDENBERG (1996)] lassen diese Gehölze auf eine sehr gute Standortanpassung sowie auf eine außergewöhnliche Vitalität der Sorten und Unterlagen schließen. Bei der Sorte handelt es sich um die 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' (SCHWÄRZEL 1996), die Unterlagen sind unbekannt. Diese speziellen Sorten-Unteralagen-Kombinationen führten zu der hohen Lebenserwartung an diesem Standort. Die Regeneration dieser Unterlagen und die Erstellung der speziellen Sorten-Unteralagen-Kombinationen ist die Voraussetzung zur Erhaltung und multivalenten Nutzung dieser wertvollen Apfelbäume.

Der Versuchszeitraum für die vorliegende Arbeit war auf die Jahre 1996 bis 1998 beschränkt. Während dieser Zeit sollte ein Verfahren zur Regeneration adulter Apfelunterlagen erarbeitet werden. Mit Hilfe verschiedener konventioneller und *In-vitro*-Verfahren wurde versucht, die Unterlagen der Versuchsbäume zur Sproßbildung anzuregen und zu vermehren. Die am ausgewählten Standort vorhandenen Sorten-Unteralagen-Kombinationen sollen wieder hergestellt und erhalten werden. Die regenerierten Unterlagen wurden mit Hilfe morphologischer Merkmale und molekulargenetischer Methoden bewertet. Es wird angestrebt, diese Unterlagen für den Streuobstanbau zugänglich zu machen und sie als Genpool zu erhalten.

¹ 'Erhaltung und multivalente Nutzung obstgenetischer Ressourcen am natürlichen Standort unter obstbaulichen,

Geschichtliche Entwicklung der Unterlagen im Obstbau

Obstbäume werden seit vielen Jahrhunderten vermehrt und herangezogen. Schon 1000 v.Chr. wurden im damaligen Persien entlang der Hauptverkehrswege Obstbäume gepflanzt. Die Römer und Griechen beschäftigten sich eingehend mit der Apfelkultur. Verschiedene Vermehrungsverfahren und Kulturbedingungen waren zu dieser Zeit bereits bekannt. Im Mittelalter spielte der Obstbau nur eine untergeordnete Rolle. Vor allem Klöster pflegten den Anbau und verbreiteten das Obst. Nach dieser Epoche begann die Forcierung des Obstbaus (LEPPIN 1931).

Den Unterlagen haben Baumschuler schon in früheren Zeiten immer eine besondere Bedeutung zugesprochen (SCHULZ 1936). Karl der Große verfaßte im Jahre 812 das ‘Capitulare de villis imperialibus’. Das 70. Kapitel enthält umfangreiches Material über die Gartenkunst und die Unterlagenfrage für Obstgehölze. Zu dieser Zeit war es üblich, auf Sämlinge zu veredeln. In den folgenden Jahrhunderten wurde immer wieder die Anzucht von Sorten auf Sämlingen für die Hochstammanzucht empfohlen (MAURER 1939). Anfang des 18. Jahrhunderts war es in Mitteleuropa üblich, Wildlinge des Holzapfels (*Malus sylvestris*) im Wald auszugraben und darauf zu veredeln. Nach HENNE (1776) sind Sämlinge von guten Edelsorten den Wildlingen (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) als Unterlage vorzuziehen. Holzäpfel (*Malus sylvestris*) waren zwar widerstandsfähiger gegen Krankheiten und weniger anspruchsvoll bezüglich des Standortes, aber zum großen Teil unverträglich mit den gängigen Sorten. Sämlinge von Edelsorten zeigten dagegen einen besseren Wuchs und ähnelten im ganzen eher den Sorten. Sie waren sehr verträglich mit den auf ihnen veredelten Sorten (CHRIST 1794). 1776 untersuchte HENNE die Unterschiedlichkeit von Sämlingen und empfahl eine Selektion nach der Aussaat. Für die Anzucht von Hochstämmen wurde in den folgenden Jahren weiterhin die Sämlingsunterlage empfohlen. Schwachwüchsige Sämlingsunterlagen sollten für die Anzucht von Zwergbäumen verwendet werden. Kleinfrüchtige Sorten sollten auf der vegetativ vermehrbaren ‘Paradies’-, großfrüchtige Sorten auf der ebenfalls vegetativ vermehrbaren ‘Doucin’-Unterlage veredelt werden. Nach 1870 begann eine Forcierung des Baumschulwesens. Mutterpflanzquartiere wurden angelegt, und es erfolgte eine stärkere Vermehrung von Obstgehölzen. Der Austausch von Jungpflanzen innerhalb Deutschlands und Europas hatte begonnen. Von der ‘Paradiesunterlage’ existierten zu diesem Zeitpunkt 4-5 Typen, von der ‘Doucinunterlage’ 12 Typen als Mischungen auf dem Markt (MAURER 1939). Das Saatgut für die Sämlingsanzucht wurde hauptsächlich von Mostobst gewonnen und stammte aus Keltereien (MEYMUND 1923). Als gute Edelsorten zur Saatgutgewinnung wurden der ‘Rote Eiserapfel’, ‘Trierer Bohnapfel’, ‘Weißer Winter Tafelapfel’, ‘Trierer Weinapfel’, ‘Rheinischer Bohnapfel’ und die ‘Schafsnase’ genannt (LORGUS 1914, MEYMUND 1923, HERR 1935). Oft wurden heimische Lokalsorten als Samenspender genutzt (PASSECKER 1970) und viele Bauern haben zu-

fällig aufgelaufene Sämlinge als Unterlage verwendet (LUCKE et al. 1992). Je nach Saatgutherkunft unterschieden sich die einzelnen Absaaten (HERR 1935).

Die Abstammung der Sämlingsunterlagen veränderte sich im Laufe der Zeit. Folgende Abfolge wurde von MAURER (1939) erstellt und von DE HAAS und HILDEBRANDS (1967) erweitert:

- urwilde Saat = aus garantierten Wildbeständen
- wilde Saat = aus nicht garantierten Wild- bzw. verwilderten Beständen
- Mostobstsaatgut = unkontrolliertes Saatgut aus Mostereien
- Handelssaatgut = mehr oder minder auf Sorten beschränktes Saatgut
- Handelssaatgut französischer Herkunft = Saatgut französischer Mostereien
(vor dem Krieg: beste einheitliche Wuchsleistung)
- Edelsaatgut = Saatgut von Kultursorten, nicht mutterpflanzenrein
- Mutterpflanzenreines Saatgut = Saatgut von jeweils einer besonders geeigneten Kultursorte
(ab 1967).

Die urwilde und wilde Saat stammte vorwiegend von *Malus sylvestris* (L.) Mill.. Nach 1918 verstärkte sich die Nachfrage nach diesen Herkünften, da anderes Saatgut stark von Pilzen und Bakterien befallen war. Das Mostobst- und Handelssaatgut wurde von Kultursorten gewonnen (hauptsächlich *Malus domestica* Borkh.). Sorten, die zu *Malus pumila* var. *domestica* Borkh. gehörten, bildeten die Herkünfte für das Edelsaatgut und das mutterpflanzenreine Saatgut. Nach BÜTTNER (1999) ist *Malus pumila* var. *domestica* Borkh. botanisch identisch mit *Malus domestica* Borkh..

Die wissenschaftliche Bearbeitung der Unterlagenfrage begann erst im 20. Jahrhundert. 90 % der Apfelsorten wurden zu diesem Zeitpunkt auf Sämlingen veredelt, deren Saatgut aus Mostobst gewonnen wurde. Untersuchungen zur Variationsbreite der Sämlingsunterlagen wurden von KEMMER und SCHULZ (1936) durchgeführt. Bisher wurden 'Booskop', 'Jakob Lebel' 'Großer Rheinischer Bohnapfel' 'Harberts Renette' und andere als gute Saatgutspender für Sämlinge empfohlen. Die Untersuchungen zeigten jedoch, daß diese Sorten triploid und daher schlechte Samenspenden waren. Geeignete diploide Sorten für die Sämlingsanzucht wurden ausgewählt (KEMMER 1936). Bereits 1967 gingen 90 % der deutschen Sämlingsanzuchten auf 'Grahams Jubiläumsapfel' (Kultursorte, vorwiegend aus norddeutschen Herkünften) und 'Bittenfelder' (Mostobst, aus süddeutschen, meist württembergischen Herkünften) zurück. Die restlichen 10 % bildeten Absaaten von 'Antonovka' (nur in Mitteldeutschland). Mischsaatgut wurde zu diesem Zeitpunkt in Deutschland nicht mehr gehandelt (DE HAAS und HILDEBRANDS 1967). An dieser prozentualen Verteilung hat sich bis heute nicht viel geändert. Die Sämlinge von 'Bittenfelder' sind die in Baumschulen am häufigsten verwendete Unterlagen für die Hochstammanzucht von Apfelgehölzen (HUSUNG 1995).

Für den Erwerbsobstbau wurden vorwiegend schwachwüchsige Unterlagen benötigt. Parallel zur Entwicklung der Sämlingsunterlagen begann die Suche nach geeigneten Klonunterlagen (SCHULZ 1936). Dies geschah vor dem zweiten Weltkrieg, unabhängig voneinander 1912 in England durch WELLINGTON und HATTON, 1911 in Deutschland durch SCHINDLER in Dresden und in Holland durch SPRENGLER (KEMMER 1936). Das bisherige Unterlagen-gemisch wurde eingehend untersucht und die noch heute gängigen Typenunterlagen in ihren Einflüssen auf die Sorten genau beschrieben. Unterlagenversuche gehören seither zum festen Bestandteil obstbaulicher Versuchsstationen. Für die Veredlung von Apfelsorten stehen eine Vielzahl von Unterlagen zur Verfügung. Dazu zählen besonders die in East Malling selektierten Typenunterlagen (EM-, M-, MM-Typen). Eine weitgehende Anpassung an Sorte, Standort, Erziehungsschnitt und Anbausystem ist durch die gezielte Auswahl bestimmter Typenunterlagen möglich (DE HAAS und HILDEBRANDS 1967). Auch in der heutigen Zeit geht die Suche nach der geeigneten Unterlage weiter. Die in Deutschland von SCHINDLER begonnenen Arbeiten wurden ab 1950 von SCHMADLAK und seit 1965 von FISCHER fortgesetzt. Neben der Schwachwüchsigkeit, der guten Vermehrbarkeit, dem guten Ertragspotential, der An-spruchslosigkeit und der Verträglichkeit mit verschiedenen Sorten trat verstärkt ein anderes Zuchtziel, die Krankheitsresistenz, in den Vordergrund (FISCHER 1996a). Kreuzungen von M9 und verschiedenen *Malus*-Arten und -Typen ergaben die Supporter-Unterlagen 1,2,3 und 4 (= Pi80). Diese haben ein besseres Resistenzverhalten als M9, eine ähnlich gute vegetative Vermehrbarkeit und bringen höhere Erträge. Die Unterlage Supporter 4 ähnelt der schwach bis mittelstark wüchsigen Unterlage M26 (FISCHER 1996b).

Diese Schilderungen zeigen, daß die ausgewählten Versuchsbäume auf Grund ihres Pflanzda-tums wahrscheinlich auf Sämlingsunterlagen veredelt wurden. Die Sämlinge waren anscheinend Gemische des damaligen Sortenspektrums. Gute Sortenbeschreibungen der zu dieser Zeit gängigen Apfelsorten finden sich bei CHRIST (1794), SCHILLER (1795) und im Sortiment-s-katalog der KÖNIGLICHEN LANDES-BAUMSCHULE bei Potsdam (1855).

Die Bedeutung der genetischen Ressourcen bei Obstgehölzen

Im Jahre 1765 erließ Friedrich der Große den Erlaß, daß jeder Bauer bei seinem Hause einen Obstgarten mit mindestens 10-12 Bäumen anlegen sollte (SPÄTH 1930). Es erfolgte eine An-siedlung von Gärtnern in und um Berlin. Der Obstbau sollte auf eine breitere Basis gestellt werden. Es wurden 40 Kreisgärtnereien errichtet, deren besondere Aufgabe in der Überwa-chung der Alleen der jeweiligen Kreise bestand. Zuvor waren bis 1750 in der Mark Branden-burg bereits 250 000 bis 300 000 Obstbäume gepflanzt worden, Ende des 18. Jahrhunderts stieg die Zahl auf 500 000 an (LEPPIN 1931).

Diese daraus resultierende Vielzahl an Sorten und Unterlagen stellte ein großes genetisches Potential dar. In den letzten Jahrzehnten wurde ein Teil dieses Genpools durch infrastrukturelle

Maßnahmen unwiederbringlich vernichtet. Zudem setzte ein altersbedingtes Sterben der Hochstammobstbäume ein, wodurch in den letzten Jahren eine bisher nie dagewesene genetische Erosion begann (SCHWÄRZEL 1997).

Die Obstzüchtung ist ständig auf der Suche nach alten Sorten und Wildarten. Dies ist besonders wichtig für die Einkreuzung von Krankheits- und Schädlingsresistenzen in neue Sorten. Alte Sorten und besonders Wildarten sind zum großen Teil Träger wertvoller Resistenzgene. Voraussetzung für die Nutzbarmachung dieser Eigenschaften ist die Aufnahme und Bewertung genetischer Ressourcen. Bei Obstsorten gibt es viele lokale Sorten und Unterlagen, die unter kleinklimatischen Verhältnissen gute Leistungen bringen und meist sehr alt sind. Hierbei handelt es sich um genetisch wertvolles Material, das der Züchtung zugänglich gemacht werden sollte (BÜTTNER und FISCHER 1995).

Im Rahmen des genannten Projektes wurde eine Vielzahl lokaler Sorten verschiedener Obstarten kartiert und pomologisch bestimmt. Diese Sortenvielfalt ist auf das Wirken der Baumschulen Späth (Berlin-Baumschulenweg) und Jungclaussen (Frankfurt/Oder) zu der damaligen Zeit in dieser Region zurückzuführen (SCHWÄRZEL und SCHWÄRZEL 1996).

Die Erhaltung der Sorten und regenerierten Unterlagen kann *in-situ*, *in-situ* on farm und *ex situ* erfolgen. Von einer *Ex-situ*-Erhaltung wird gesprochen, wenn die genetischen Ressourcen in Genbanken, Spezial- und Arbeitssammlungen, Botanischen Gärten und Arboreten erhalten werden. Bleiben die genetischen Ressourcen am natürlichen Standort erhalten, so wird dies als *In-situ*-Erhaltung bezeichnet. Bei der *In-situ*-Erhaltung on farm handelt es sich um die Bewahrung der genetischen Ressourcen in landwirtschaftlichen Betrieben und als Sammlungen in Gärten.

Der Vorteil der *Ex-situ*-Erhaltung liegt in der schnellen Verfügbarkeit der genetischen Ressourcen für die Züchtung und Forschung. Die genetische Konstitution der Individuen bleibt erhalten. Es erfolgt keine Vermischung mit anderen Genotypen, wie dies bei der *In-situ*-Erhaltung der Fall sein kann. Andererseits kann die Veränderung des Genpools *in situ* gut beobachtet werden. Diese Form der Erhaltung bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Genotypen zu erhalten. Die Erhaltung *in situ* on farm schränkt die Anzahl Genotypen auf Grund des erhöhten Platzbedarfes ein. Eine vorherige Auswahl bestimmter Genotypen ist Voraussetzung. Neben der *In-situ*-Erhaltung bietet die *In-situ*-Erhaltung on farm die Möglichkeit, Resistenzen aufzufinden, da die Genotypen hier den vorhandenen und wechselnden Erregerpopulationen ausgesetzt sind (WEBER 1996).

Alle drei Erhaltungsmaßnahmen werden für die zu regenerierenden Unterlagen und die herzustellenden Sorten-Unterlagen-Kombinationen angestrebt. Dies ist notwendig, um das genetische Potential für die Züchtung und Forschung zugänglich zu machen.

2 Zielstellung

Im Obstbau stehen nur wenige Unterlagen für den Streuobstanbau sowie für die Nutzung von Obstgehölzen in der freien Landschaft zur Verfügung. Die Bereitstellung weiterer Unterlagen, die sich besonders durch eine hohe Vitalität und ein hohes Lebensalter auszeichnen, ist wünschenswert.

Ziel dieser Arbeit ist es, Verfahren zur Regeneration adulter Unterlagen zusammenzutragen, zu entwickeln und auf ihre Anwendbarkeit zu testen. Die Arbeiten werden exemplarisch an Unterlagen adulter Apfelbäume durchgeführt. Die Übertragung auf andere Spezies wird angestrebt.

Eine Vielzahl konventioneller und *In-vitro*-Verfahren steht für die Regenerationsversuche zur Verfügung. Hierbei handelt es sich zum Teil um Verfahren, die heute für die Vermehrung von Unterlagen nicht mehr herangezogen werden. Sie bieten aber auf Grund des Alters der zur Verfügung stehenden Materials praktikable Möglichkeiten zur Vermehrung. Aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Regenerationsverfahren sollen die ausgewählt werden, die sich als effizient erweisen. Die am besten geeigneten Verfahren sollen optimiert werden.

Die regenerierten Unterlagen sollen mit Hilfe morphologischer und molekulargenetischer Methoden bewertet werden. Die Gleichheit oder Verschiedenheit der Unterlagen der einbezogenen Bäume soll auf diese Weise festgestellt werden. Ebenso wird mit Hilfe dieser Methoden herauszufinden sein, ob sich die Unterlage von der Sorte des jeweiligen Baumes unterscheidet. Wenn es möglich ist, soll eine taxonomische Zuordnung der Unterlagen zu Sorten oder Wildarten erfolgen. Die Testung des Virusstatus der Unterlagen wird angestrebt.

Über den Versuchszeitraum hinaus ist eine Nachkommenschaftsprüfung der Unterlagen vorgesehen. Neues genetisches Potential kann auf diese Weise für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

Ein Vorschlag für die Vorgehensweise bei Versuchen zur Regeneration adulter Unterlagen wird den Abschluß der Arbeit bilden.

3 Literaturübersicht

Für die Versuche zur Regeneration adulter Unterlagen stehen verschiedene konventionelle und *In-vitro*-Verfahren zur Verfügung.

3.1 Konventionelle Verfahren zur Regeneration

Im Rahmen der konventionellen Verfahren wurde eine Regeneration über Wurzelschnittlinge, Veredlungen, Verletzungen der Wurzeln der Versuchsbäume und durch Stecklingsvermehrung angestrebt.

Wurzelschnittlinge

Die Möglichkeit der Vermehrung über Wurzelschnittlinge ist vom Genotyp abhängig. SHAW (1919) vermehrte 14 verschiedene Apfelsorten mit einem Erfolg von 3 bis 93 % über Wurzelschnittlinge. KEMMER und GISEVIUS (1948) erzielten bei verschiedenen *Malus*-Typenunterlagen prozentuale Ausbeuten von bis zu 15 % im Herbst des Versuchsjahres. Wurzelschnittlinge von *Malus sylvestris* dagegen ergaben zu 12,2 % lebensfähige Pflanzen. MÖHRING (in PASSECKER 1970) regenerierte die Apfelsorte 'Klarapfel' zu 32 bis 42 % und die Birnensorte 'Williams Christ' zu 10 % über Wurzelschnittlinge.

Der optimale Ernte- und Steckzeitpunkt von Wurzelschnittlingen wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. HILKENBÄUMER (1948) empfiehlt, die Wurzelschnittlinge verschiedener *Malus*-Unterlagen im Herbst zu ernten. Nach einer Lagerung in mäßig feuchtem Sand erfolgte das Abstecken im Frühjahr. Nach Versuchen mit einjährigen Apfelsämlingen schließt sich MAC DANIELS (1952) dieser Meinung an. KEMMER und GISEVIUS (1948) untersuchten den optimalen Ernte- und Steckzeitpunkt von Wurzelschnittlingen bei verschiedenen *Malus*-Typenunterlagen und -Sämlingen, ebenfalls bei Birnen-, Pflaumen- und Vogelkirschensämlingen. Die Herbsterte und -pflanzung (im November) erbrachte die besten Ergebnisse. Eine Lagerung wird nicht empfohlen, da die Wurzelschnittlinge während dieser Zeit zu rotten begannen. Die gesteckten Wurzelschnittlinge wurden im Freiland unter einer Torfschicht vor Frosteinwirkung geschützt. ROBINSON und SCHWABE (1977a) verglichen die Regenerationsfähigkeit von Wurzelschnittlingen verschiedener *Malus*-Sorten auf der Unterlage M26 im zweimonatlichen Entnahmerhythmus über die Jahre 1972 und 1973. Sie stellten fest, daß saisonale Effekte einen Einfluß auf die Regenerationsfähigkeit haben. Die Ernte sollte nicht in der Wachstumsphase und bei einsetzendem Frühjahr stattfinden. Im Sommer geerntete Wurzelschnittlinge trieben nicht aus, sie verrotteten im Substrat. Die frühe Frühjahrsernte oder späte Herbsterte mit anschließender Lagerung im Kühlraum wird empfohlen.

KEMMER und GISEVIUS (1948) teilten die geernteten Apfelwurzelschnittlinge nach dem Durchmesser in Klassen ein. Es wurden drei Klassen gebildet: 0,3 - 0,6 cm, 0,7 - 1,0 cm und 1,1 bis 1,6 cm. Die höchsten Regenerationsraten erzielten die Wurzelschnittlinge mit den Durchmessern der letzten beiden Klassen. HILKENBÄUMER (1948) empfiehlt, Wurzelschnittlinge bei Apfel mit einem Durchmesser zwischen 0,5 und 1,5 cm für die Vermehrung zu nutzen. Ebenso spricht sich ROBINSON (1975) für Wurzelschnittlinge mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,2 cm aus.

HILKENBÄUMER (1948) empfiehlt die Anzucht von Wurzelschnittlingen im warmen Kasten oder im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen. KEMMER und GISEVIUS (1948) hatten geringe Erfolge bei der Anzucht im Freiland und im Gewächshaus. Starke Pilzinfektionen führten im Gewächshaus zu Ausfällen um die 90 %. Sie bevorzugten den kalten Kasten als Vermehrungsbeet. ROBINSON (1975) erzielte die besten Ergebnisse im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen und rät von der Anzucht im Freien ab. HARTMANN et al. (1997) weisen darauf hin, daß die Reaktion von Wurzelschnittlingen bezüglich der Regenerationsfähigkeit unter verschiedenen Anzuchtbedingungen genotypabhängig ist.

Das senkrechte Stecken der Wurzelschnittlinge und eine Abdeckung mit 1 cm Substrat brachte bei Versuchen von HILKENBÄUMER (1948) die besten Ergebnisse. ROBINSON (1975) empfiehlt, die Wurzelschnittlinge etwa 0,5 cm aus dem Substrat herausragen zu lassen. Versuche hatten gezeigt, daß diese Schnittlinge nach dem Austreiben die besseren Überlebensraten zeigten. Neben dem senkrechten Stecken wird das horizontale Legen der Wurzelschnittlinge in das Substrat und ein Abdecken mit 1 cm Substratschicht empfohlen. Dies führte zu einer Bildung von mehr Trieben je Wurzelschnittling als beim senkrechten Abstecken.

Die Sproßbildung der von ROBINSON (1975) gesteckten Wurzelschnittlinge setzte nach acht Tagen ein. Nach vier bis sieben Tagen beobachteten ROBINSON und SCHWABE (1977a) ein Schwellen des Periderms und nach 10 bis 15 Tagen die ersten Sprosse. Versuche von MAC DANIELS (1952) an Wurzelschnittlingen von einjährigen Apfelsämlingen zeigten, daß die Sproßbildung nach 10 Tagen einsetzte. Nach PASSECKER (1973) sind die Sprosse, die an Wurzelschnittlingen gebildet werden, aus dem Pericykel hervorgegangen.

Die Sproßbildung findet überwiegend am oberen Drittel der Wurzelschnittlinge statt. Es ist eine Polarität zu erkennen (MAC DANIELS 1952, ROBINSON und SCHWABE 1977a).

Neben einer Sproßbildung an den Wurzelschnittlingen müssen neue Wurzeln gebildet werden, damit lebensfähige Einzelpflanzen entstehen (KEMMER und GISEVIUS 1948). Nach HARTMANN et al. (1997) ist jedoch eine Wurzelneubildung an Wurzelschnittlingen artabhängig.

Die Regenerationsfähigkeit über Wurzelschnittlinge wird deutlich vom Alter der Mutterpflanzen beeinflusst. Besonders bei alten Bäumen versagt die Vermehrung über Wurzelschnittlinge (KEMMER und GISEVIUS 1948). Wurzelschnittlinge von jüngeren Bäumen erbrachten die besten Ergebnisse. Schon 4jährige Apfelsämlinge reagierten mit geringeren Ausbeuten im Vergleich zu 1jährigen Sämlingen. Mit zunehmendem Alter der Mutterpflanzen stieg die Vieltriebigkeit der Wurzelschnittlinge (ROBINSON 1975).

Nach PASSECKER (1977) zeigen die Sprosse von Wurzelschnittlingen zunächst juvenilen Charakter. Der Übergang in die adulte Phase erfolgt schneller als bei vergleichbaren Sämlingen. Die Juvenilität nimmt nach ROBINSON (1975) in folgender Reihenfolge ab: Junge Sämlingssprosse, Sprosse von Wurzeln junger Sämlinge, Sprosse von Wurzeln junger Kulturbäume, Sprosse von Wurzeln alter Kulturbäume, Wasserreiser von der Stammbasis, Wasserreiser vom Stammverlauf.

Veredlungen

Bereits 1935 hat sich RIEBESEL die Veredlung von Reisern auf Wurzelstücke der gleichen Art/Sorte patentieren lassen. Werden Reiser von als Unterlagen verwendeten Arten genutzt, so dient dieses Verfahren als Vermehrungsmethode der Unterlagen. Um Edelsorten auf eigener Wurzel anzuziehen, werden Reiser der gewünschten Sorten verwendet. Von 1929 bis 1935 wurden Versuche mit Pfirsich-, Vogelkirsch-, Walnuß-, Birnen- und Apfelunterlagen und -sorten durchgeführt. Bei Apfel wurden verschiedene „Doucinklone“ in Bezug auf ihre Vermehrbarkeit mit Hilfe dieser Methode geprüft. Die Reiser wachsen zunächst mit Hilfe der Wurzelstücke, die als Unterlage verwendet werden. Eine Tiefpflanzung bewirkt eine Bewurzelung der Reiser und die Freimachung von der Unterlage (Ammenveredlung). Bei Obstsorten, die gute Stammbildner sind, wird die direkte Veredlung auf Wurzelstücke empfohlen.

OBENDIECK und LUCAS führten schon 1876 ein seltenes Propfexperiment durch. Zwei Birnensorten wurden auf Quitte veredelt. Als einjährige Veredlung wurde eine Pflanze aus dem Substrat herausgenommen und die Wurzeln gesäubert. Die Sorte dieser Pflanze wurde mit der Sorte der anderen Pflanze veredelt, indem die erste Pflanze umgekehrt auf die zweite aufgesetzt wurde. Die Wurzeln der Unterlage der ersten Pflanze standen umgekehrt in der Luft. Aus diesen Wurzeln entsprangen nach einjähriger Weiterkultur Sprosse. Die Ernährung der Sprosse wurde von den Sorten und der Unterlage der ersten und zweiten Pflanze übernommen. Die Sprosse der Wurzeln dienten als Unterlagen für die Veredlung mit weiteren Sorten. ROBINSON (1975) brachte Wurzelstücke von Apfelsämlingen nach der Veredlung auf ausgewachsene Bäume zum Austreiben. Die gebildeten Sprosse dienten als Grundlage für weitere Vermehrungsversuche.

Die Standfestigkeit der veredelten Bäume wird stark durch das Wurzelsystem geprägt. Unabhängig von der Vermehrungsart befindet sich bei Apfelbäumen die Hauptmasse der Wurzeln in einer Tiefe bis zu einem Meter. Bei Sämlingen erfolgt in den ersten 20 Lebensjahren eine Umstimmung des Wurzelkörpers. Es findet eine Neubildung von Wurzeln an der Stammbasis statt. Dies ist durch die in der Wurzelkrone stark ausgeprägte Basisförderung begründet. Die Tiefwurzler werden zu Flachwurzlern. Die Standfestigkeit ist durch die vorhandene Pfahlwurzel gewährleistet, solange keine Unterschneidung stattfindet (KEMMER 1956). Die Vermehrungsherkunft hat einen großen Einfluß auf die Ausbildung des Wurzelsystems der Pflanzen. Bei vegetativ vermehrten Unterlagen fehlt im Vergleich zur Sämlingsunterlage die Pfahlwurzel. Aus der Sproßbasis entsteht eine Adventivwurzel. Die Pflanzen sind Flachwurzler (HILKENBÄUMER 1948). Die Pfahlwurzeln von Sämlingsunterlagen werden in ihrer Ausprägung durch Unterschneiden in den Obstanlagen unterdrückt. In der freien Landschaft und im Streuobstanbau unterbleibt diese Kulturmaßnahme, so daß sich die Pfahlwurzel voll entwickeln kann.

WALDENMAIER (1991) verglich das Wuchsverhalten *in vitro* vermehrter, stecklingsvermehrter und veredelter Pflanzen der Rosensorte 'Roter Stern'. Innerhalb der Vegetationsperiode blühten *in vitro* vermehrte Pflanzen früher und öfter als konventionell vermehrte. Zudem zeigten die *in vitro* vermehrten Pflanzen eine stärkere Verzweigung von der Basis an aufwärts. Die stecklingsvermehrten Pflanzen lagen bezüglich der beobachteten Parameter zwischen den *in vitro* vermehrten und den veredelten Pflanzen. Diese Unterschiede hoben sich im zweiten und dritten Kulturjahr wieder auf. *In vitro* vermehrte Pflanzen sind in ihrem Habitus Sämlingen sehr ähnlich (HACKETT 1985, MEIER-DINKEL 1989).

Nach der Veredlung von mikrovermehrten Reisern der Sorte 'Greensleeves' auf mikrovermehrte Unterlagen (M27, M9 und M25) wiesen die Bäume juvenile Merkmale wie starkes Triebwachstum und spätes Fruchten auf. Die Unterlagen neigten zur Bildung von Wurzelschossen und Wildtrieb Bildung aus der Basis (JONES und HADLOW 1989).

MAURER (1939) rät davon ab, bei Obst Veredlungen auf Triebe von Wurzelschnittlingen durchzuführen. Versuche hatten gezeigt, daß nach Herausnahme von drei- bis fünfjähriger Baumschulware der ehemalige Wurzelschnittling leicht an der Stelle abbricht, an der sich der Sproß gebildet hatte. Die Pflanzen verlieren auf diese Weise einen großen Teil ihres Wurzelsystems.

Mit Hilfe von Veredlungen kann ein 'Rejuvenilisierungseffekt' erzielt werden. Dieser wird in der Literatur in drei Ausprägungen unterteilt: negativ, intermediär und positiv. Die Veredlung 12jähriger Reiser von *Pinus taeda* auf zweijährige Sämlinge führte nicht zu einer Verjüngung der ausgetriebenen Sprosse (negativ). Temporäre Rückkehr in die Juvenilität erfolgte durch Veredlungen, der beschriebenen Art und Weise, bei *Cupressus sempervirens*, *Larix laricina* und *Malus*-Sorten (intermediär). Bei *Hedera helix* wurde erstmalig bleibende Rejuvenilisierung mit Hilfe der Veredlungen erzeugt (positiv) (PIERIK 1990). Die Verjüngung zeigt sich,

indem Blatt-, Wachstums-, und Habitusmerkmale sowie die Bewurzelungsfähigkeit, die für Sämlinge der untersuchten Arten typischen Ausprägungen zurückgewinnen. Die Nähe der adulten Meristeme zum juvenileren Wurzelsystem ist für die verjüngende Wirkung der Veredlungen verantwortlich (BONGA 1987). Die in den juvenilen Wurzeln produzierte Gibberelline (GREENWOOD 1987) oder Cytokinine (GREENWOOD 1987, PIERIK 1990) können einen rejuvenilisierenden Effekt bewirken.

Verletzung der Baumwurzeln

Durch eine Verletzung der Wurzeln der Versuchsbäume und durch Anwendung verschiedener Phytohormone ist es möglich Wurzel- und Sproßwachstum zu induzieren. Die Auswahl des Phytohormons wirkt entscheidend auf Wurzel- und Sproßbildung. Hohe Auxin- und geringe Cytokininegehalte fördern die Wurzelbildung, geringe Auxin- und hohe Cytokininegehalte die Sproßbildung (PIERIK 1987). Bei alten Papaya-Bäume behandelte DREW (1988) die Schnittstellen nach einer Verletzung mit 225 mg/l BAP (eingebettet in Lanolin) und induzierte hierdurch eine Sproßbildung.

Stecklingsvermehrung

Die Ergebnisse der Stecklingsvermehrung von Obstunterlagen sind genotypabhängig. Die Bewurzelungsprozente können jedoch durch vorgeschaltete Behandlungen der Mutterpflanzen und optimierte Anzuchtbedingungen für die Stecklinge angehoben werden. Die Apfelunterlage M9 ist über Stecklinge schwer zu vermehren. HOWARD (1988) erzielte bei Stecklingen von jungem Ausgangsmaterial ohne weitere Behandlung eine Bewurzelungsrate von 15 %. Die Anzucht erfolgte unter einem Folientunnel bei hoher relativer Luftfeuchte im Gewächshaus. Nach einer Etiolierung der Mutterpflanzen konnten die Bewurzelungsprozente auf 85 - 82 % angehoben werden. OSTERC und SPETHMANN (1998) setzten für die Stecklingsvermehrung von Kirsch- und Apfelunterlagen eine Hochdrucknebelanlage (Fog-Anlage) ein. Das Stecksubstrat wurde mit Osmocote (8-9 M (16+8+12+2) oder 3-4 M (15+11+13+2)) aufgedüngt. Die Stecklingsbasis wurde mit IBS (0,5 % + 10 % Euparen, Basis: Talkum) behandelt. Die prozentuale Ausbeute für die Unterlage M9 lag mit unter 20 % nicht entscheidend höher als zuvor erwähnt. Für die neuen Pillnitzer - Unterlagen (PiS1, PiS2, PiS3) und die Unterlage M27 wurden zwischen 59 und 81 % bewurzelte Stecklinge erzielt. Die Ausfälle nach der Überwinterung lagen bei 5 %.

Ein wesentlicher Faktor bei der Stecklingsvermehrung ist die erfolgreiche Überwinterung der bewurzelten Stecklinge. SPETHMANN (1985) führte verschiedene Überwinterungsexperimente mit *Prunus avium* - Stecklingen durch. Die Überwinterung im frostfreien Gewächshaus

und in der Klimakammer (0°C und 100 % rLF) führte zu Ergebnissen von 50 bis 100 % Ausbeute an lebensfähigen Pflanzen. PLIETZSCH (1997) stellte bei Stecklingsversuchen mit verschiedenen Ziergehölzen fest, daß die Überwinterungsbedingungen zweitrangig sind, wenn die Stecklinge noch im Vermehrungsjahr zu maximalem Sproßwachstum angeregt werden.

Das Alter des Mutterpflanzenmaterials hat einen entscheidenden Einfluß auf die Bewurzelungsfähigkeit von Stecklingen (CLARK 1981). Die Vermehrung von Apfelunterlagen über Grünstecklinge ist verhältnismäßig einfach, wenn es sich um juvenile Triebe handelt, die von im Gewächshaus vorgetriebenen Mutterpflanzen geschnitten wurden (PASSECKER 1970). Stecklinge von adultem Material lassen sich schwer bewurzeln. Das Mutterpflanzenalter wird neben der Entnahmestelle der Stecklinge als der wichtigste Einfluß auf den Erfolg einer Stecklingsvermehrung hervorgehoben (SPETHMANN 1997).

Sprosse von Wurzelschnittlingen sind Triebe mit juvenilem Charakter (PASSECKER 1977). Stecklinge von Trieben der Wurzelschnittlinge von Apfelsämlingen unterschiedlichen Alters zeigten hohe Bewurzelungsprozente (ROBINSON 1975). OSBORNE (1986) führte Stecklingsversuche mit unterschiedlich altem Ausgangsmaterial der Apfelunterlage 'Ottawa 3' durch, die in Kanada vielfach verwendet wird. Diese Unterlage geht sehr früh in die adulte Phase über, so daß für die Stecklingsvermehrung überwiegend physiologisch altes Material zur Verfügung steht. Die Vermehrung über Wurzelschnittlinge konnte erfolgreich durchgeführt werden. Stecklinge von diesen Trieben wurden zu 86 % erfolgreich bewurzelt. Der Ausfall nach Überwinterung lag bei 4 %. Stecklinge, die von den adulten Mutterpflanzen geschnitten wurden, konnten zu 16 % bewurzelt werden. Die Überwinterung war für keinen bewurzelten Steckling erfolgreich. Die Ergebnisse zeigen deutlich den Einfluß des Mutterpflanzenalters.

Besonders bei schwer vermehrbaren Gehölzen wird die Verwendung von *in vitro* vermehrten Mutterpflanzen für die Stecklingsvermehrung empfohlen. Diese zeigen einen veränderten Juvenilitätsstatus, der sich durch ein erhöhtes Bewurzelungspotential der gewonnenen Stecklinge im Vergleich zu denen von konventionell vermehrten Mutterpflanzen auszeichnet (PLIETZSCH 1996).

3.2 *In-vitro*-Verfahren

Die *In-vitro*-Kultur wird angewendet, wenn die konventionellen Verfahren zur Vermehrung nicht oder mit hohem Aufwand möglich sind. Das Ausgangsmaterial hat einen entscheidenden Einfluß auf das Gelingen dieses Vermehrungsverfahrens. Adultes und juveniles Material zeigen große Unterschiede in der Vermehrbarkeit. Die Vermehrung von adultem Material ist oft mit Schwierigkeiten verbunden (RIFFAUD und CORNU 1981). Für die *In-vitro*-Kultur können verschiedene Explantate genutzt werden.

Wurzelstücke

Bei *Malus* wurden bisher nur sehr wenige Untersuchungen zur Regeneration von Kalli, Sprossen oder Embryonen über *in vitro* gebildete Wurzeln durchgeführt (LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. 1991a). An Wurzeln von intakten *In-vitro*-Pflanzen von M25 induzierten JONES et al. (1984) Kallus- und Sproßwachstum. Isolierte *In-vitro*-Wurzeln regenerierten dagegen nicht.

Das Alter der Explantate hat auch hier einen entscheidenden Einfluß auf die Regenerationsfähigkeit. SON und HALL (1990) untersuchten *in vitro* gebildete Wurzeln von *Populus* in bezug auf ihre Fähigkeit, Knospen und Sprosse zu bilden. 60 Tage alte Wurzeln erbrachten die größte Anzahl an Sprossen im Vergleich zu jüngeren Wurzelstücken. Für die Anregung zu Wurzel- oder Sproßwachstum *in vitro* werden verschiedene Phytohormone eingesetzt, von denen das Auxin 2,4 D das stabilste ist. Dieses wird in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet, wenn die Zellteilungsaktivität über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben soll. Damit wird jedoch eine Differenzierung verhindert. Der exogene Zellstimulus entfällt nach Überführung auf hormonfreie Medien. Das endogene Hormonsystem induziert von da an Sproß- und Embryowachstum. 2,4 D ist zudem verantwortlich für eine verstärkte Kallusbildung (NEUMANN 1995).

Der Einsatz von TDZ bewirkt einen starken Cytokinineffekt bei einer großen Breite von Spezies (FELLMANN et al. 1987). TDZ wird eine höhere Aktivität zugesprochen als anderen Cytokininen. Bei geringen Etablierungserfolgen wird TDZ als Ersatz von BAP verwendet (BORKOWSKA und LITWINCZUK 1993). Die Reaktion von TDZ ist genotypabhängig (REYNOLDS 1987). Bei hohen Konzentrationen erfolgt abnormes Wachstum. Die benötigten Konzentrationen sind auf die Genotypen abzustimmen (MOK et al. 1987). SANKHLA et al. (1994) setzten TDZ erfolgreich zur Regeneration von Sprossen aus *In-vitro*-Wurzeln bei *Albizia julibrissin* ein.

Den Einfluß einer Dunkel- und Lichtphase bei der Regeneration von Sprossen an *in vitro* gebildeten Wurzeln bei *Robinia pseudoacacia* L. stellte SEELIGER (1956) fest. In der Phase der Knospeninduktion war Licht nicht notwendig. Das Sproßwachstum wurde gefördert, wenn die weitere Kultur unter Licht stattfand. Im Dunkeln vergeilten die Sprosse.

Kallusstücke

Kallus ist mehr oder weniger organisiertes Tumorgewebe, das gewöhnlich an Wunden von differenzierten Geweben und Organen gebildet wird. Bei vielen Pflanzen ist es möglich, Kallus zu induzieren und auf geeigneten Medien weiterzukultivieren. Aus Kallus können sowohl Wurzeln als auch Sprosse entstehen. Hohe Auxin- und geringe Cytokininegehalte im Medium fördern die Wurzelbildung, geringe Auxin- und hohe Cytokininegehalte die Sproßbildung (PIERIK 1987).

In der Regel handelt es sich um *in vitro* kultiviertes Gewebe, das zu diesen Versuchen herangezogen wird. FEUCHT und TREUTTER (1995) gelang die Induktion von Kalli an *Prunus avium*-Pflanzen *in vivo* sowie dessen erfolgreiche Desinfektion. Die Kallusstücke konnten *in vitro* zum Weiterwachstum angeregt werden, eine Regeneration von Sprossen wurde jedoch nicht erreicht.

JAMES et al. (1984) induzierten Kallus an Sproßsegmenten der *in vitro* vermehrten Apfelunterlagen M9, M25, M26 und M27. Die Weiterkultur der isolierten Kalli auf einem BAP-haltigen Medium führte bei M25 zu einer Sproßbildung bei 30 % der Explantate. Die Kalli der Unterlagen von M9, M26 und M27 regenerierten dagegen nicht zu Sprossen. An Cotyledonen von *in vitro* herangezogenen Sämlingen von *Malus domestica* 'Fuji' induzierten LIU et al. (1994) Kallus. Bei der Weiterkultur der globulären Kalli wurden zu 60 % Sprosse gebildet. DRUART (1980) beobachtete eine Organogenese aus Kalli erst nach mehreren Subkulturen. Es wurde festgestellt, daß der Ursprung der Kalli einen Einfluß auf die Organogenese hat. Die Regeneration aus Kallusgewebe verläuft bei juvenilen Pflanzen unproblematischer als bei adulten.

Sprosse

Es gibt eine Vielzahl von Einflüssen, die auf den **Etablierungserfolg** einwirken. Neben dem Entnahmezeitpunkt der Explantate, dem Alter und dem physiologischen Zustand der Mutterpflanze haben die Größe und Herkunft der Explantate sowie die Auswahl der Medien einen Einfluß auf den Etablierungserfolg. Als Explantate eignen sich bei Apfel neben Sproßspitzen ebenfalls Meristeme (WALKEY 1972, SRISKANDARAJAH und MULLINS 1981) und Sproßsegmente (HICKS und NAIR 1986, NIEWKIRK et al. 1986).

Zur Etablierung aufgesetzte Sprosse verbräunen bei Apfel sehr schnell (BLOCK 1993). Dies kann durch eine Kühlphase beeinflusst werden, da die geringen Temperaturen die phenolische Biosynthese und damit die Verbräunung reduzieren (HILDEBRAND und HARNEY 1988). Durch Zusatz von Ascorbinsäure und Aktivkohle wird ebenfalls geringere Verbräunung erzielt (ZIV und HALEVY 1983, PREIL und ENGEHARD 1977). Die höchsten Etablierungsraten erzielten WANG et al. (1994) für *Malus domestica* 'Fuji' nach Vorkultur auf ascorbinsäure- und aktivkohlehaltigem Medium und einer Kühlphase von sechs Tagen bei 5°C. Der Verbräunung der Sprosse und damit dem vorzeitigen Absterben kann mit einer zeitweisen Überschichtung mit sterilfiltriertem 8-Hydroxy-chinolin-sulfat in unterschiedlichen Konzentrationen entgegengewirkt werden. Der Transfer der Sprosse innerhalb weniger Tage auf frisches Medium mit evtl. unterschiedlicher Zusammensetzung verringert ebenfalls die Verbräunung. Sproßspitzen von 20-40jährigen *Malus*-Sorten reagierten gut auf diese Behandlung und wurden erfolgreich *in vitro* etabliert und vermehrt (LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. 1991a).

Zur Steigerung des Etablierungserfolgs werden in der Literatur verschiedene Desinfektionsmöglichkeiten angeführt, wobei eine einmalige Desinfektion des öfteren nicht ausreichend war. Die Anwendung verschiedener Verfahren ist notwendig, um die prozentuale Ausbeute an etablierten Sprossen zu steigern. JONES et al. (1979) nutzten als Desinfektionsmittel für die Sproßspitzen von fünf Apfelsorten Domestos (10 %, 40 min.). Die Ausfallraten lagen bei 70 - 90 %. Eine Desinfektion der Sprosse von 20-40jährigen *Malus*-Sorten mit Natriumhypochlorid (NaOCl, 10 %ig, 20-30 min.) war nur erfolgreich, wenn noch weitere Verfahren zur Verminderung des Verbräunens der Explantate nachgeschaltet wurden (LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. 1991b). Ähnliche Erfahrungen machte BLOCK (1993) bei der Etablierung von Sprossen der Apfelunterlage M9. Die Desinfektion mit Calciumhypochlorid ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 3 %ig für 10-15 min.) war nicht sehr erfolgreich. Zusätzliche Maßnahmen gegen Verbräunung und Kontamination der Explantate mußten angewendet werden.

Der Etablierungserfolg wird vom Juvenilitätsstatus des Ausgangsmaterials beeinflusst. Sprosse von jüngeren Mutterpflanzen lassen sich in der Regel leichter etablieren als von älteren (THEILER-HEDTRICH und THEILER-HEDTRICH 1990). Vorgetriebene Zweige ermöglichen eine Verbesserung des Etablierungserfolgs von adultem Material (LAIMER et al. 1988a).

Für die Vermehrung von Apfelsprossen werden verschiedene Medien empfohlen. Am häufigsten wird ein modifiziertes MS-Medium verwendet (LE 1985, SEINGRE et al. 1991, AI-PING et al. 1995 u.a.). Ebenfalls gute Vermehrungsraten wurden auf veränderten LS-Medien erreicht (WALKEY 1972, JAMES und THURBON 1981, SINGHA 1989 u.a.).

Die erzielten Sproßanzahlen je Subkultur sind bei *Malus* stark vom Genotyp abhängig. Es wurden zwischen 1,2 und 6,3 Sprosse je Ausgangsexplantat gebildet (HANKE 1994, JAMES und THURBON 1981).

Das Sproßwachstum kann durch die Zugabe von Auxinen und von Cytokinin beeinflusst werden (HUETTEMANN und PREECE 1993), wobei die Konzentration der Auxine (überwiegend IBS) deutlich unter denen der Cytokinine (überwiegend BAP) liegt. Die Angaben schwanken zwischen 0,1 und 2,0 mg/l und sind genotypabhängig. Dies bestätigen Untersuchungen von HUTCHINSON (1984), WEBSTER und JONES (1989), PAWLICKI und WELANDER (1995) sowie SEIFFERT et al. (1995) an unterschiedlichen Genotypen bei Apfel. Der Zusatz von Gibberellinsäure zu cytokinin- und auxinhaltigen Medien wird für Apfelunterlagen und -sorten für einige Genotypen eingesetzt, wenn eine Sproßstreckung erforderlich ist. Die Konzentrationen (0,5 - 1,0 mg/l) liegen über denen des genutzten Auxins und unter denen des verwendeten Cytokinins oder entsprechen letzterem (CHONG und PUA 1985, BLOCK 1993, YEPES und ALDWICKLE 1994).

Die Zuckerquelle hat einen entscheidenden Einfluß auf das Sproßwachstum. CHONG und PUA (1985) sowie WELANDER et al. (1989) stellten bei Apfel auf einem sorbitolhaltigem Medium positive Effekte bezüglich des Sproßwachstums fest. Durch den Wechsel der Sprosse der Unterlage M9 von saccharosehaltigem auf sorbitolhaltiges Medium wurde die Vermehrungsrate erhöht und die Verbräunung eingeschränkt (BLOCK 1993). Bei gleicher Hormonzusammensetzung erzielte HANKE (1994) bei verschiedenen Genotypen von Apfelsorten und -unterlagen höhere Sproßanzahlen auf einem Medium mit Sorbitol. PAWLICKI und WELANDER (1995) und SEIFFERT (1995) nutzen für die Vermehrung der Unterlage M9 'Jork' ebenfalls Sorbitol als Zuckerquelle im Medium. Im Vergleich zu Saccharose wird Sorbitol während des Autoklavierens nicht hydrolysiert. Es bleibt in der Konstitution erhalten und steht den Explantaten in vollem Umfang zur Verfügung (CHONG und TAPER 1972).

In der Literatur wird vielfach auf die Abhängigkeit der **Bewurzelungsrate** vom Genotyp hingewiesen. (JAMES und THURBON 1979, DUNSTAN 1981, KUNNEMANN und ALBERS 1992, DE KLERK et al. 1997). JAMES und THURBON (1981) stellten in ihren Versuchen mit Sprossen der Unterlage M9 zudem Unterschiede zwischen einzelnen Linien fest. Mit zunehmender Subkultur wurde ein Anstieg der Bewurzelungsrate beobachtet (BLOCK 1993). Als Parameter für einen guten Bewurzelungserfolg wird vielfach die Wurzelanzahl angegeben (KRIEKEN et al. 1993, DE KLERK et al. 1997).

Das Verfestigungsmittel hat einen Einfluß auf den Bewurzelungserfolg, die Wurzelanzahl sowie auf Wachstum und Entwicklung der Sprosse. Für jede Pflanzenart sind Verfestigungsmittel mit einer optimalen Wirkung bekannt. Das am häufigsten genutzte Verfestigungsmittel ist Agar. Dieses zeigt unterschiedliche Wirkung, insbesondere bezüglich der Charge und bei Bezug von verschiedenen Herstellern (SCHOLTEN und PIERIK 1998). Als Alternative zu Agar wird Gelrite empfohlen. Gelrite ist ein hochgereinigtes, natürliches Heteropolysaccharid, das in Gegenwart löslicher Salze stabile, agarähnliche Gele bildet. Es ermöglicht kürzere Präparationszeiten durch schnellere Gelbildung, zeigt keine toxischen Kontaminationen, ist nicht mutagen und bleibt auch bei hohen Temperaturen stabil. Als Verfestigungsmittel wurde Gelrite bei vielen holzigen Pflanzen mit unterschiedlichem Erfolg angewendet. Die Vorteile von Gelrite liegen außerdem in der mehrfachen Autoklavierbarkeit und der kontinuierlich gleichen Qualität. Zudem wird nur etwa die Hälfte der Menge des Agars benötigt (ANONYM 1997). Wurde Gelrite bei *Malus*-Kulturen verwendet, so trat jedoch Vitrifizierung auf (TURNER und SINGHA 1990).

Die Bedingungen während der Vermehrung und Bewurzelung haben einen Einfluß auf den **Akklimatisationserfolg** (JESCH 1997). Hormon- und Zuckerkonzentrationen sowie Art und Menge des Verfestigungsmittels *in vitro* wirken *in vivo* weiter (KUNNEMANN und ALBERS 1992). Durch gezielte Strategien ist es möglich, die Sprosse bereits in der sterilen Phase zu konditionieren und den Akklimatisationserfolg zu erhöhen. Die durchzuführenden Strategien sind genotypabhängig. (DONNELLY 1993). Die Qualität der Pflanzen hat einen

entscheidenden Einfluß auf eine optimale Überführung (DE BERGH 1991) und den Überwinterungserfolg im ersten Jahr (JESCH 1997). Nach einer Kultur auf Flüssigmedium für 10 Tage im Gewächshaus konnten 90 % der bewurzelten Sprosse von M9 erfolgreich akklimatisiert werden (JONES et al. 1979). Die besten Überlebensprozente nach der Akklimatisation erzielten KUNNEMANN und ALBERS (1992) für verschiedene *Malus*-Sorten und -Unterlagen, wenn im Vermehrungsmedium die volle Konzentration der Makronährstoffe und 30 g/l Saccharose enthalten war.

Blätter

Die Herkunft des Blattmaterials hat einen entscheidenden Einfluß auf das Gelingen der Regenerationsversuche. Organogenese kann nur stattfinden, wenn undifferenziertes Palisaden- oder Parenchymgewebe zur Verfügung steht (WELANDER 1988). Bei vollentwickelten Blättern ist das morphogenetische Potential nicht mehr vorhanden, so daß die Blattentnahme von jungen Pflanzen empfohlen wird (DUFOUR et al. 1986). Am besten sind Blätter von *In-vitro*-Pflanzen geeignet, die schon mehrere Subkulturen durchlaufen haben. Die obersten vier Blätter zeigen höhere Regenerationsraten als die darunter liegenden (SWARTZ et al. 1990, THEILER-HEDTRICH und THEILER-HEDTRICH 1990, HANKE et al. 1991, FAMIANI et al. 1994).

Neben der Herkunft des Blattmaterials wirkt der Genotyp entscheidend auf den Erfolg der Regeneration (JAMES et al. 1984, SRISKANDARAJAH et al. 1990). Im Vergleich zu Sorten zeigten Unterlagen und Unterlagenstämme bei Apfel eine geringe Regenerationsfähigkeit über Blattexplantate (HANKE et al. 1991).

Das ausgewählte Medium wirkt auf Kallus- und Sproßbildung. WELANDER (1988) empfiehlt als Grundmedium das N6. Der Salzgehalt ist gegenüber anderen Medien reduziert. Stickstoff liegt überwiegend in der reduzierten Form vor. Dies wirkt fördernd auf Regenerationsprozesse. HANKE et al. (1991) stellten einen starken Einfluß dieses Grundmediums auf die Kallusproduktion fest. Zur Regeneration von Sprossen aus Blattstücken wird das MS-Medium empfohlen.

Als Phytohormone werden zur Regeneration hauptsächlich BAP und TDZ in unterschiedlichen Konzentrationen als fördernd beschrieben (SWARTZ et al. 1990, HANKE et al. 1991, FAMIANI et al. 1994, FERRADINI et al. 1996). NAA und 2,4 D werden ebenfalls angewendet (JAMES et al. 1984, SWARTZ et al. 1990).

3.3 Möglichkeiten zur Bewertung der regenerierten Unterlagen

Die Bewertung und taxonomische Zuordnung der regenerierten Unterlagen kann mit Hilfe morphologischer und molekulargenetischer Untersuchungen erfolgen.

Morphologische Untersuchungen

Zur morphologischen Unterscheidung bei Apfel werden vegetative und generative Merkmale herangezogen wobei die Merkmale an Blüte und Frucht als aussagekräftiger als die vegetativen Merkmale bezeichnet werden. Ihre Ausprägungen sind konstanter, da sie weniger stark von der Umwelt beeinflusst werden (KRUMBHOLZ 1939). REMMY und GRUBER (1993) befaßten sich eingehend mit der Morphologie des Wildapfels. WAGNER (1996) stellte anhand von einschlägigen Bestimmungs- und Florenbüchern sowie weiterer Literatur einen Kriterienkatalog zur Unterscheidung von Wild- und Kulturapfel zusammen. Hierbei werden sowohl vegetative Merkmale (an Zweigen und Blättern) als auch generative (an Blüten und Früchten) einbezogen. Im Bundessortenamt werden zur Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit jeweils 20 Pflanzen in die Beobachtungen einbezogen (ANONYM 1992). Zur Unterscheidung der Blütenmerkmale untersuchte KRUMBHOLZ (1939) jeweils 10 Blütenstände von *Malus*-Kultursorten.

Molekulargenetische Untersuchungen

Molekulargenetische Methoden auf Grundlage der von WILLIAMS et al. (1990) entwickelten RAPD-Technik (Random Amplified Polymorphic DNA) werden vielfach für Identitätsbestimmungen und taxonomische Klassifizierungen verwendet (TINGEY und DEL TUFO 1993). Mit Hilfe dieser Technik wiesen KOLLER et al. (1993) Unterschiede zwischen verschiedenen Apfelsorten nach. DUNEMANN et al. (1994) stellten umfangreiche Untersuchungen zu Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Wildtypen und Kultursorten bei Apfel an.

Zur Isolierung der DNA bei Apfel werden die von DOYLE und DOYLE (1990), EDWARDS (1991) und CLARK (1997) entwickelten Verfahren genutzt.

Die RAPD-Technologie nutzt die PCR, um von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmte DNA-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen. Die Polymerasekettenreaktion ist ein thermocyclisches Verfahren, bei dem nach jeder Wiederholung bestimmter Reaktionsschritte die Anzahl der DNA-Abschnitte verdoppelt wird. Die Doppelstränge der DNA werden durch Erhitzen getrennt (Denaturierung). Primer (einzelsträngige DNA-Moleküle bestimmter

Sequenzen) lagern sich an den komplementären Bereichen der einzelsträngigen DNA an (Hybridisierung). Durch Anwesenheit einer DNA-Polymerase (hitzestabiles Enzym) und Desoxynucleosidtriphosphaten werden die Primer entlang der einsträngigen DNA verlängert (Polymerisation). Auf diese Weise werden neue DNA-Stränge mit komplementären Sequenzen zur Matrize erstellt. Die einzelnen Reaktionsschritte von Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation werden wiederholt. Am Ende der Reaktion stehen für weiteren Analysen die durch die Primer festgelegten Bereiche der DNA, in Abhängigkeit von der Zyklenanzahl, in größeren Mengen zur Verfügung (NEWTON und GRAHAM 1994).

Virustestung

Spontaninfektionen mit Viren sind bei alten Kernobstbäumen nicht zu erwarten. Da bei Apfelvirosen keine Samenübertragbarkeit bekannt ist, wird davon ausgegangen, daß die alten Sorten im allgemeinen auf virusfreie Sämlingsunterlagen veredelt wurden (PASSECKER 1976). Erst durch die Einführung vegetativ vermehrter Typenunterlagen (um 1900) sind die Viruskrankheiten in das Kernobstsortiment gelangt (GROPE 1994).

Für den Virusnachweis ist in Abhängigkeit vom Genotyp bei der Probeentnahme die unterschiedliche Verteilung der Viren im Pflanzengewebe zu beachten. Der CLSV (Apple Chlorotic Leaf Spot Virus) und der SGV (Apple Stem Grooving Virus) verteilen sich relativ gleichmäßig im Pflanzengewebe, während die Verteilung des ApMV (Apple Mosaic Virus) ungleichmäßig ist. Es erfolgt eine Abnahme zur Spitze hin. Zudem erfolgt bei allen genannten Viren eine ungleichmäßige Verteilung im Verlauf der Vegetationsperiode (GRÜNTZIG et al. 1994).

Für die Bestimmung des ApMV, CLSV, SGV wird der ELISA Test empfohlen (FUCHS et al. 1979). In vergleichenden Untersuchungen für den CLSV fanden SCHIMANSKI et al. (1993) heraus, daß für die einbezogenen Kultursorten der ELISA-Test und für Wildäpfel der Pfropftest in der Aussagefähigkeit überlegen war. Die negativen Ergebnisse des ELISA-Testes werden darauf zurückgeführt, daß die verwendeten Antiseren nicht in der Lage waren, die in den Pflanzen vorhandenen CLSV zu erkennen.

Ist ein ELISA-Test nicht möglich, so erfolgt die Testung über Gehölzindikatoren. Letzteres hat den Nachteil, daß getestetes Pflanzenmaterial erst nach mehreren Jahren zur Verfügung steht (KNAPP 1995).

4 Material und Methoden

Im Rahmen des Projektes wurden acht repräsentative Obstbäume der Gattung *Malus* aufgrund ihres hohen Alters und ihrer Vitalität ausgewählt. Die Bäume stehen an einem Feldweg zwischen Tempelberg und Gölsdorf in der Nähe von Müncheberg (Landkreis Märkisch-Oderland, 50 km östlich von Berlin, Abb. A 1.1). Sie stammen aus einer Pflanzung von 1804. Dies geht aus der Chronik des Grafen von Hardenberg hervor, dessen Familie in langer Tradition die umliegenden Flächen ackerbaulich nutzt (HARDENBERG 1996). Die Bäume werden der Vitalitätsstufe 0 und 1 (Schädigungsgrad 0 bis 25 %) zugeordnet (FORSCHUNGSGESELLSCHAFT LANDSCHAFTSENTWICKLUNG, LANDSCHAFTSBAU 1993). Die Stammumfänge in 1,20 m Höhe betragen zwischen 2,50 und 3,0 m. Die Gesamthöhen liegen zwischen fünf und sieben Metern.

Bei der Sorte handelt es sich bei allen acht Bäumen um die 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' (SCHWÄRZEL 1996), die Unterlagen sind unbekannt. Die Veredlungsstelle der Versuchsbäume ist nicht eindeutig zu erkennen. Die Regenerationsversuche der Unterlagen wurden deshalb auf den Wurzelraum beschränkt. Das Wurzelsystem der Versuchsbäume wurde im Radius von 1 m und in einer Tiefe bis zu 1 m zu einem Drittel vorsichtig freigelegt. Dazu wurden Spaten, kleine Schaufeln, Spachtel und kleine Handfeger eingesetzt. Die Wurzeln wurden in Hauptwurzeln und Seitenwurzeln der jeweiligen Ordnung eingeteilt und gekennzeichnet. Die Anordnung der Wurzeln im freigelegten Wurzelsystem wurde fotografisch dokumentiert. Die Kennzeichnung der Bäume erfolgte mit Hilfe der von SCHWÄRZEL (1996) festgelegten Kartierungsnummern 1, 2, 53, 55, 58, 96, 98 und 101. Diese Bezeichnungen werden weiterhin verwendet.

Im Versuchszeitraum von 1996 bis 1998 kamen verschiedene konventionelle und *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration der Unterlagen zur Anwendung.

4.1 Konventionelle Verfahren zur Regeneration

4.1.1 Wurzelschnittlinge

Eine Regeneration über Wurzelschnittlinge ist bei Apfelsorten und -unterlagen nach ROBINSON und SCHWABE (1977a) möglich. Es wird empfohlen, die Wurzelschnittlinge auf eine Länge von 10 - 20 cm zu schneiden. Die Anzucht im Gewächshaus bei 25 °C und einer rLF um 70 % führte zur höchsten Ausbeute an regenerierten Wurzelschnittlingen. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche ließen eine Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit vom Durchmesser der Wurzelschnittlinge erkennen. Schnittlinge mit einem Durchmesser von einem Zentimeter regenerierten besser als solche mit größerem oder kleinerem Durchmesser.

Schräg in das Substrat gesteckte Wurzelschnittlinge führten zu einzelnen, kräftigen Sprossen. Horizontal in das Substrat eingebettete Wurzelschnittlinge bildeten viele Sprosse, die für Versuche zur Stecklingsvermehrbarkeit genutzt wurden. HARTMANN et al. (1997) stellten fest, daß Wurzelschnittlinge von Pekannußbäumen (*Carya illinoensis*) eher Wurzeln als Sprosse bildeten, wenn sie in Stammnähe des Spenderbaumes geerntet wurden und umgekehrt. Eine Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit bezüglich der Anordnung im Gesamtwurzelsystem wurde für die eigenen Versuche vermutet.

Nach Freilegung des Wurzelsystems im Frühjahr des jeweiligen Versuchsjahres wurden Wurzelstücke unterschiedlicher Länge geschnitten. Das untere Ende der Schnittlinge wurde zur Markierung der Polarität angeschrägt. Getrennt nach Versuchsbäumen wurden sie zum Transport in feuchten Torf eingebettet. Die Ernte erfolgte in den Versuchsjahren 1996 und 1997 abhängig von der Anordnung der Wurzeln im Gesamtwurzelsystem. Es erfolgte eine Zuordnung zu Seitenwurzeln bestimmter Ordnung oder zu Hauptwurzeln. Die Ernte- und Stecktermine der Wurzelschnittlinge der Versuchsjahre zeigt Tab. 1.

Tab. 1: Ernte- und Stecktermine der Wurzelschnittlinge (1996 bis 1998)

Tab. 1: Time of harvesting and sticking of the root cuttings (1996 to 1998)

Jahr	Baum-Nr.	Erntetermin	Stecktermin	
			GH ¹	F ²
1996	53	22.04.	29.04	06.05. ³
	55	19.04.	29.04.	06.05
	58	19.04.	29.04	06.05.
1997	53	24.03.	25.03.	- ⁴
	55	24.03.	25.03.	-
	58	26.03.	27.03	05.05
	101	26.03.	27.03.	05.05
	98	01.04.	02.04.	05.05
	96	01.04.	02.04.	05.05
	1	03.04.	04.04.	05.05
	2	03.04.	04.04.	05.05
1998	53	01.04.	03.04.	24.04
	55	01.04.	03.04.	24.04
	58	01.04.	03.04.	24.04
	96	07.04.	09.04.	24.04
	98	07.04.	09.04.	24.04
	101	07.04.	09.04	24.04
	1	08.04.	09.04.	24.04
	2	08.04.	09.04.	24.04

1: GH = Gewächshaus

2: F = geschütztes Freiland (Folientunnel)

3: Lagerung zwischen Ernte- und Steckzeitpunkt in Substrat eingebettet im Kühlraum bei + 4 °C

4: keine Versuche im entsprechenden Versuchsjahr

Auf Grund der Witterung - der Boden war zuvor stark gefroren - war 1996 die Ernte erst Ende April möglich. In den Versuchsjahren 1997 und 1998 begann die Ernte Anfang April.

Nach einer Zwischenlagerung im Kühlraum bei + 4 °C wurden die Wurzelschnittlinge im Jahr 1996 einige Tage nach der Ernte, in den Jahren 1997 und 1998 jeweils einen Tag nach der Ernte, aufbereitet. Sie wurden in ca. 15 cm lange Stücke geschnitten. Das distale Ende wurde angeschrägt. Der Durchmesser am proximalen Ende wurde gemessen und diente als Zuordnungsmerkmal für sechs verschiedene Klassen (Tab. 2).

Tab. 2: Klasseneinteilung der geernteten Wurzelschnittlinge in Abhängigkeit vom Durchmesser (1996 bis 1998)

Tab. 2: Classification of the root cuttings in dependence of the diameter (1996 to 1998)

Klasse	Durchmesser (cm)
1	0,1 - 0,5
2	0,6 - 1,0
3	1,1 - 1,5
4	1,6 - 2,0
5	2,1 - 2,5
6	2,6 - 3,0

Getrennt nach Versuchsbäumen und abhängig von der Zuordnung im Gesamtwurzelsystem sowie der Klassenzugehörigkeit wurden die Wurzelschnittlinge in einer randomisierten Blockanlage, mit dreifacher Wiederholung im Gewächshaus und im Freiland abgesteckt. 1998 wurde auf eine Zuordnung zum Ursprung im Gesamtwurzelsystem verzichtet. Die Ergebnisse der beiden vorhergehenden Versuchsjahre hatten gezeigt, daß auf Grund des geringen Pflanzenmaterials eine Auswertung hinsichtlich dieses Parameters nicht möglich war.

Das Stecken erfolgte im Gewächshaus in ein beheizbares Tischbeet. Das Substrat bestand aus Torf / Sand / Perlite (3:1:1) mit einem Zusatz von kohlen-saurem Kalk (3 kg/m³). Der pH-Wert betrug 5.6. Die Wurzelschnittlinge wurden schräg (Winkel ca. 45 ° zur Oberfläche) in das Substrat gesteckt. Das proximale Ende der Wurzelschnittlinge ragte nicht mehr als 0,5 cm aus dem Substrat heraus. Der Abstand zwischen den Reihen betrug 20 cm. In der Reihe wurde in einem Abstand von 1 cm gesteckt. Wurzelschnittlinge, deren Durchmesser mehr als 3 cm betrug, wurden horizontal, ca. 2,5 bis 4 cm tief, in das Substrat gelegt. Alle weiteren Kulturbedingungen wichen nicht von den oben genannten ab.

Nach dem Abstecken wurde das Tischbeet mit einer Milchfolie (Stärke 0,045 mm) flach abgedeckt, um eine rLF um 70 % und eine gleichmäßige Temperaturverteilung (um 25 °C) zu gewährleisten. Nach Triebbeginn der Wurzelschnittlinge wurde der Luftraum unter der Folie vergrößert, um den Trieben genügend Raum zum Wachstum zur Verfügung zu stellen. Temperatur und Luftfeuchte wurden auf dem genannten Niveau gehalten.

Die Bodentemperatur sollte nicht über 30 °C und die Lufttemperatur nicht über 35 °C ansteigen, da bei höheren Temperaturen Wurzelatmung und Sproßwachstum eingeschränkt sind (ROBINSON 1975). Eine Kontrolle von Temperatur und Luftfeuchte erfolgte mit Hilfe eines Thermohydrographen. Die Substrattemperatur wurde mit einem Bodenthermometer gemessen. Bei hohen Temperaturen erfolgte Schattierung und/oder Lüftung. Eine gleichmäßige Feuchte des Substrates sollte für die optimale Versorgung der Wurzelschnittlinge gewährleistet sein. Eine Vernässung des Substrates mußte vermieden werden, da die Wurzelschnittlinge sonst zu verrotten beginnen.

Im Freiland wurden die Wurzelschnittlinge in ein Grundbeet unter einem Milchfolientunnel (Stärke 0,045 mm, Tunnelgröße 2 x 3 x 1,5 m) in gleicher Weise gesteckt. Der gewachsene Boden (Sand, BZ 20 - 22, JESCH 1996) wurde 20 cm tief gefräst und mit dem oben beschriebenen Substrat aufgebessert.

In monatlichen Abständen wurde im Gewächshaus und im Freiland Previcur (0,15 %) gegen Pilze und ab Juli Wuxal Super (0,02 %) zur Stärkung der gebildeten Sprosse gegossen. Die Bewässerung wurde manuell durchgeführt.

Im Laufe der Vegetationsperiode wurden die gebildeten Sprosse der Wurzelschnittlinge langsam abgehärtet. Im Herbst des jeweiligen Versuchsjahres wurden die Wurzelschnittlinge, die Sprosse gebildet hatten, getopft.

Es wurden folgende Parameter während der Vegetationsperiode erhoben bzw. im nachhinein ermittelt:

- Beginn der Sproßbildung und deren Weiterentwicklung über die Vegetationsperiode
- Größe der gebildeten Sprosse
- Anzahl der Wurzelschnittlinge mit Sproßbildung und prozentuale Ausbeute am Ende der Vegetationsperiode
- Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit der Schnittlinge vom Durchmesser und vom Ursprung im Gesamtwurzelsystem
- Anzahl der gebildeten Sprosse je Schnittling zu Beginn und am Ende der Vegetationsperiode
- Ursprungsort der Sprosse an den Wurzelschnittlingen
- Wurzelbildung an den Schnittlingen nach einer Vegetationsperiode.

Die Auswertung erfolgte tabellarisch. Bei genügend großer Stichprobe wurde ein Chi-Quadrat-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$) zur Auswertung herangezogen.

Die gebildeten Sprosse der Wurzelschnittlinge der jeweiligen Versuchsjahre dienten als Ausgangsmaterial für die Stecklingsvermehrung und für die Versuche zur Sproßetablierung *in vitro*.

Die Wurzelschnittlinge des Jahres 1996 wurden im Frühjahr 1998 im Freiland zur weiteren Beobachtung aufgepflanzt. Zuvor wurden sie, wie auch die Wurzelschnittlinge der anderen Versuchsjahre, einmal jährlich umgetopft.

4.1.2 Veredlungen

Um die Wurzelschnittlinge der Unterlagen zu Sproß- oder Wurzelbildung anzuregen und um die Sorten-Unterlagen-Kombination der einzelnen Versuchsbäume zu reproduzieren, wurden verschiedene Veredlungskombinationen durchgeführt (Tab. 3).

Als Sämlingsunterlage wurde 'Bittenfelder' ausgewählt, da diese die in Baumschulen am häufigsten verwendete Sämlingsunterlage ist (HUSUNG 1995). Die Unterlagen stammten aus virusfreien Beständen einer Jungpflanzen-Baumschule in Schleswig-Holstein.

Die Verwendung eines Wurzelschnittlings als Pfropfpartner wird von ROBINSON (1975) empfohlen, da die Veredlung von Wurzelstücken auf Zweige ausgewachsener Apfelbäume zur Sproßbildung führte. Um die Wurzelschnittlinge der verschiedenen Unterlagen zum Treiben anzuregen, wurden sie 1996 bis 1998 auf 'Bittenfelder' veredelt.

Tab. 3: Durchgeführte Veredlungskombinationen (1996 bis 1998)

Tab. 3: Grafting combinations (1996 to 1998)

Unterlage	Pfropfpartner
'Bittenfelder'	Wurzelschnittling
'Bittenfelder'	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'
Wurzelschnittling	'Golden Delicious'
Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'

Die Wurzelschnittlinge wurden als Unterlage für die Veredlung mit der Sorte des jeweiligen Versuchsbäumchen genutzt. Die Sorten-Unterlagen-Kombination des Ausgangsbäumchen sollte auf diese Art und Weise wieder hergestellt werden. RIEBESEL (1935) empfiehlt dieses Verfahren für Apfel und Birne.

Durch Veredlungen der Kombination 'Bittenfelder' / 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' sollten die Sorten der einzelnen Versuchsbäume auf dem Versuchsgelände in Köpenick zur Verfügung stehen. Dies war für vergleichende Untersuchungen zwischen Unterlagen und Sorte notwendig.

Die Sorte 'Golden Delicious' eignet sich gut als Veredlungspartner. Der als Unterlage verwendete Wurzelschnittling sollte durch diese Sorte zum Wachstum angeregt werden. Nach gelungener Veredlung und einem Rückschnitt auf die Unterlage sollte letztere zum Austreiben gebracht werden.

Im Juni 1998 wurde auf eine vorgetriebene, schwachwuchsinduzierende Unterlage (M9) der Sproß eines in diesem Jahr getriebenen Wurzelschnittlings veredelt. GRIESMEIER (1992) erzielte mit dieser Methode der Grünveredlung gute Anwuchsergebnisse bei verschiedenen Apfelbäumen. Durch dieses Verfahren wird der Übergang in die generative Phase verfrüht

(SCHMIDT 1986). Der schnelle Übergang der regenerierten Unterlagen in diese Phase würde eine Beschreibung über blütenmorphologische Merkmale ermöglichen und eine Zuordnung zu Wildtyp oder Kultursorte erleichtern.

Um feststellen zu können, ob die regenerierten Unterlagen Sorten- oder Wildtypcharakter zeigten, wurden in den drei Versuchsjahren morphologische Merkmale und molekulargenetische Methoden herangezogen (Kapitel 4.3).

In den Versuchsjahren 1997 und 1998 wurden zusätzlich die bis dahin regenerierten Unterlagen - abhängig von der Vermehrungsherkunft - in die Veredlungsversuche einbezogen.

Die Veredlungen wurden im Frühjahr des jeweiligen Versuchsjahres als Handveredlungen nach der Wurzelschnittlingsernte durchgeführt. Die Pflanzen wurden getopft und unter rLF von 80 - 90 % zum Austreiben angeregt. Die getriebenen Veredlungen wurden nach erfolgreicher stufenweiser Abhärtung im Freiland weiterkultiviert. Die Überwinterung erfolgte frostfrei im Gewächshaus. Die Veredlungen der Jahre 1996 und 1997 wurden im jeweils darauffolgenden Frühjahr im Freiland aufgepflanzt.

Das Anwachsergebnis der Veredlungen wurde in den einzelnen Versuchsjahren tabellarisch festgehalten (siehe Anhang A5).

4.1.3 Verletzung der Baumwurzeln

Um Wurzel- und Sproßwachstum der Versuchsbäume anzuregen, wurden 1996 und 1997 die Wurzeln nach der Ernte der Wurzelschnittlinge gezielt verletzt. Nach MAC DANIELS (1952) ist eine Adventivknospen-, Wurzel- und Sproßbildung an Wurzeln von Bäumen nach einer Verletzung möglich. Die Wurzeln der Versuchsbäume wurden mit einem scharfen Messer bis auf das Kambium angeschnitten und mit IBS (Trägermedium : Lanolin) in den Konzentrationen 1 % oder 5 % behandelt. Ein Einschnüren mit Draht sollte ebenfalls eine Sproß- und Wurzelbildung bewirken. Die verletzten Wurzelstücke wurden mit Ballenleinen umwickelt und mit einem Gemisch aus Torf und gewachsenem Boden (1:1) in einer Schicht von ca. 30 cm bedeckt. Dies sollte vor einem Austrocknen der Wurzeln schützen. Im Verlauf der Vegetationsperiode wurden die behandelten Wurzelstücke im vierwöchigen Abstand auf Wurzel- und Sproßwachstum bonitiert. Da die Ergebnisse dieser Behandlung nicht zufriedenstellend waren (siehe Kapitel 5.1.3), wurde 1998 auf dieses Verfahren zur Regeneration verzichtet.

4.1.4 Stecklinge

Zur Weiterkultur getriebener Wurzelschnittlinge empfiehlt ROBINSON (1975) die Bewurzelung einzelner Sprosse. Bei *Malus sylvestris* gelang die Bewurzelung, wenn die Sprosse den Wurzelschnittlingen im Zwei- bis Dreiblattstadium entnommen wurden.

Zur Prüfung der Stecklingsvermehrbarkeit der Regenerate wurden die Sprosse der Wurzelschnittlinge des jeweiligen Versuchsjahres herangezogen. 1996 wurden Bewurzelungsversuche für Sprosse der Unterlagen 53, 55 und 58 durchgeführt. Ebenso wurden Sprosse der Sorte dieser drei Versuchsbäume gesteckt. Aufgrund der geringen Sproßbildung der Wurzelschnittlinge wurden in den beiden folgenden Versuchsjahren nur die Sprosse der Unterlagen 1, 2 und 55 in die Stecklingsversuche einbezogen. Im Versuchsjahr 1997 standen *in vitro* vermehrte Pflanzen der Unterlagen 55 und 58 als Mutterpflanzen für die Stecklingsversuche zur Verfügung. Es wurde jeweils zu einem Termin geworben und gesteckt (Tab. 4).

Tab. 4 : Stecktermine und Ausgangsmaterial für die Bewurzelungsversuche (1996 bis 1998)

Tab. 4: Time of sticking and starting material for the rooting experiments (1996 to 1998)

Baum	Stecktermin	Ausgangsmaterial
53	27.06.1996	Sproß vom Wurzelschnittling
55		Sproß vom Wurzelschnittling
58		Sproß vom Wurzelschnittling
Sorte 53		Sproß vom Versuchsbaum
Sorte 55		Sproß vom Versuchsbaum
Sorte 58		Sproß vom Versuchsbaum
1	05.06.1997	Sproß vom Wurzelschnittling
2		Sproß vom Wurzelschnittling
55		Sproß vom Wurzelschnittling
55	16.09.1997	Sproß von <i>In-vitro</i> -Pflanze (akklimatisiert 1997)
58		Sproß von <i>In-vitro</i> -Pflanze (akklimatisiert 1997)
1	26.06.1998	Sproß vom Wurzelschnittling
2		Sproß vom Wurzelschnittling
55		Sproß vom Wurzelschnittling

Die Stecklinge wurden auf eine Länge von ca. 4 cm geschnitten. Aufgrund der geringen Größe der Triebe der Wurzelschnittlinge war es nicht möglich, längere Stecklinge zu werben. Bis auf die oberen drei Blätter wurden alle weiteren entfernt. Die Stecklinge wurden mit 1 %igem IBS (Trägermedium : Talkum) behandelt und in ein Standardsubstrat-Kies-Gemisch (1:1) in Multitopfplatten (24 Töpfe, à 0,1 l Volumen) gesteckt. Das Standardsubstrat bestand

aus Hochmoortorf (Zersetzungsgrad H2 bis H5) und 25 % Perlite sowie einer geringen Grunddüngung. Das Substrat wurde vor dem Stecken mit Malipur (1 %ig) gegossen. Die Bewurzelung erfolgte unter Folie bei einer rLF von 95 % (Fog-System). Mit Hilfe eines doppelt gelegten Kunststoffgewebes (J 56 aus Polyethylen) wurde bei Bedarf schattiert. Nach 8 Wochen wurde mit der Abhärtung der bewurzelten Stecklinge begonnen. Die Pflanzen wurden zum Ende der Vegetationsperiode getopft und frostfrei überwintert. Die Stecklinge des Versuchsjahres 1996 wurden im Frühjahr 1998 im Freiland aufgepflanzt. Einige dieser Pflanzen wurden 1998 als Veredlungsunterlagen genutzt.

Als Parameter wurden die Bewurzelungs- und Überwinterungsraten erhoben. Die Auswertung erfolgte tabellarisch. Eine Anwendung parametrischer oder parameterfreier Verfahren war auf Grund der geringen Stichprobengröße nicht möglich.

4.2 *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur *In-vitro*-Regeneration stand die Frage, welche Gewebe sich für einen Kulturaufbau am besten eignen. Als Explantate standen zunächst Wurzelstücke der jeweiligen Unterlagen sowie Kalli (gebildet nach der Verletzung der Wurzeln der Versuchsbäume) zur Verfügung. Nach der Regeneration über Wurzelschnittlinge wurden die Spitzen der gebildeten Sprosse und Blattsegmente für die *In-vitro*-Kultur genutzt. Die Grundzusammensetzung des verwendeten MS-Mediums ist im Anhang nachzulesen (Tab. A 2.2.1)

4.2.1 Wurzelstücke

Die Regeneration über Wurzelstücke wird in der Literatur vielfach beschrieben. Als Ausgangsmaterial wurden *in vitro* gebildete Wurzeln verwendet. Durch Zugabe unterschiedlicher Hormone induzierten DUFOUR et al. (1986) an *In-vitro*-Wurzeln verschiedener Apfelsorten Kalluswachstum. Nach LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. (1991a) ist es bisher noch nicht gelungen, aus *In-vitro*-Wurzeln intakte Pflanzen bei Apfel zu regenerieren.

Für die Versuche der Jahre 1996 bis 1998 standen *in vivo* gebildete Wurzeln zur Verfügung. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Regeneration über *In-vitro*-Wurzeln dienten als Anhaltspunkte für die durchgeführten Regenerationsversuche.

Für die Etablierungsversuche *in vitro* wurden in den Versuchsjahren 1996 und 1997 Wurzelstücke mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 cm je Versuchsbäum geerntet. Bis zur weiteren Aufbereitung erfolgte eine Lagerung im Kühlraum bei + 4 °C in feuchtem Torf. Die Erntebereiche im Wurzelsystem der Versuchsbäume wurden markiert. Im September der Versuchsjahre erfolgte eine zusätzliche Ernte. Ausgangsmaterial waren die nach der Verletzung der Wurzeln (Kapitel 4.1.3 / 5.1.3) neu gebildeten Wurzeln.

Die stark mit Erde verschmutzten Wurzelstücke wurden zunächst vorsichtig mit Bürste und Schwamm in warmem, mit Spülmittel versetztem Wasser gereinigt. Eine gründliche Nachspülung folgte mit klarem Wasser. Getrennt nach den Versuchsbäumen wurden die Wurzeln mit Hilfe eines Skalpell auf 1 cm Länge geschnitten und verschiedenen Desinfektionsmethoden unterzogen. Jede Versuchsvariante setzte sich aus 10 Wurzelstücken zusammen. 1996 wurden Wurzeln der Unterlagen 53, 55 und 58, in dem Versuchsjahr 1997 zusätzlich die der Unterlagen 1, 2, 96, 98 und 101 in die Versuche einbezogen.

Zur Reinigung und zum Auswaschen unerwünschter, hauptsächlich an der Oberfläche anhaftender Substanzen und Kontaminationen, wird das Wässern für mehrere Stunden („leaching“) empfohlen (JONES et al. 1979). Unter laufendem Leitungswasser wurden die Wurzelstücke

für zwei Stunden dieser Behandlung unterzogen. In der Kontrollvariante wurde auf diese zusätzliche Reinigung verzichtet. Zusätzlich erfolgte die von LAIMER et al. (1988b) empfohlene Alkoholbehandlung. Die Wurzelstücke wurden für 30 Sekunden in eine Lösung aus 70 %igem Alkohol (Kennzeichnung: mA) getaucht, die Kontrolle (Kennzeichnung: oA) wurde dieser Behandlung nicht unterzogen. Anschließend wurde eine Desinfektion mit Quecksilberchlorid (HgCl_2 , 0,2 %ig) für vier, sechs oder acht Minuten durchgeführt. Alle Explantate wurden dreimalig mit sterilem Wasser nachgespült.

Die desinfizierten Wurzelstücke wurden auf verschiedene Medien zur Regeneration aufgesetzt. Das Grundmedium war ein modifiziertes MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG 1962) mit dem Zusatz von Thiamin (0,1 mg/l), Pyridoxin (0,5 mg/l), Nicotinsäure (0,5 mg/l), Glycin (0,2 mg/l), 30 g/l Saccharose und einem pH-Wert von 5,8. Als Verfestigungsmittel wurde Agar (8 g/l) oder Gelrite (3 g/l) zugesetzt. Die Hormone unterschieden sich in ihrer Art und Menge je nach Versuchsvariante (Tab. 5). Als Kontrolle wurde jeweils ein hormonfreies Medium verwendet. Eine Subkultur umfaßte vier Wochen. Nach dieser Zeit erfolgte ein Umsetzen auf ein frisches Nährmedium. Die Dauer der Hormonbehandlung wurde variiert. Die Hormonzusätze erfolgten zum einen während der gesamten Versuchsdauer in jeder Subkultur und wurden zum Vergleich bei anderen Versuchsvarianten nach ein oder zwei Subkulturen abgesetzt. Die Explantate wurden dann auf hormonfreies Medium umgesetzt. Bei einzelnen Varianten setzte die Hormonbehandlung erst nach einer Subkultur auf hormonfreiem Medium ein.

Tab. 5: Verwendete Hormone und deren Konzentrationen in den Versuchen zur Regeneration über Wurzelstücke (1996 und 1997)

Tab. 5: Hormones and their concentration used in the experiments for the regeneration by root segments (1996 and 1997)

Hormon	Konzentrationen (mg/l)
IBS	0,1
2,4 D	0,1 / 0,2 / 0,4
BAP	2,0
TDZ	0,1 / 0,2
GA ₃	0,1

Die Medien wurden bei 121 °C und einem Druck von 1,2 bar für 15 Minuten sterilisiert. Als Kulturgefäße dienten Röhren mit Wulstrand (Durchmesser 2,5 cm, Höhe 9,5 cm). In jedes Röhren wurde 10 ml Medium abgefüllt. Die Explantate wurden horizontal auf das Medium (ein Wurzelstück je Röhren) aufgelegt und bis zur Hälfte hineingedrückt. Die Röhren wurden mit steriler Aluminiumfolie verschlossen.

Explantate von Apfel verbräunen *in vitro* sehr schnell und sterben ab. Dies ist auf die Oxidation phenolischer Substanzen zurückzuführen (BLOCK 1993). Um dies zu vermeiden wurden, neben einer unbehandelten Kontrolle, die Explantate der Versuche 1996 und 1997 auf das oben genannte Grundmedium (jedoch mit halber Makronährstoffkonzentration, Tab. 2.2.2) unter dem Zusatz von 2 g/l Aktivkohle und 100 mg/l Ascorbinsäure aufgesetzt. Nach HANKE (1996) schränkt eine Kühlphase von einigen Tagen im Dunkeln auf diesem Medium die Verbräunung ein. Für drei Tage wurden die Wurzelstücke im Kühlschrank (4° C) im Dunkeln kultiviert. Danach erfolgte ein Umsetzen auf das zu testende Regenerationsmedium und die Weiterkultur unter Licht.

Ebenfalls wird zur Vorbeugung gegen eine Verbräunung der Explantate eine Überschichtung mit 8-Hydroxy-chinolin-sulfat (Chinosol, 8HQS) in unterschiedlichen Konzentrationen und für eine unterschiedliche Anwendungsdauer empfohlen. Hierdurch konnte bei der Etablierung von Sproßspitzen alter Apfelsorten die Verbräunung eingedämmt und gleichzeitig die Infektionsrate gesenkt werden (LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. 1991b).

Aus diesem Grund wurden die Wurzelstücke 1997 für 18 Stunden mit sterilfiltriertem Chinosol in den Konzentrationen von 0,05 %, 0,1 % und 0,2 % vollständig überschichtet. Nach dieser Behandlung erfolgte ein Umsetzen auf frisches Nährmedium.

Die Explantate wurden im Dunkeln in einer abgedeckten Schale kultiviert. Bei Beginn von Kallus- und/oder Sproßbildung erfolgte die weitere Kultur bei 25 µmol/m² x sek., einem Tag/Nachtrhythmus von 16 zu 8 Stunden und einer Temperatur von 22 (+- 2) °C. Um den Einfluß der Dauer der Dunkel- und Lichtphase auf den Regenerationserfolg zu überprüfen, wurden einige Versuchsvarianten für die Dauer von nur einer Subkultur im Dunkeln kultiviert.

Über den Versuchszeitraum hinweg wurden folgende Parameter beobachtet bzw. anschließend ermittelt:

- Etablierungserfolg in Abhängigkeit von der Desinfektionsvariante und der darauffolgenden Weiterbehandlung
- Bakterien und Pilzbefall
- Regenerationserfolg
- Einfluß des Nährmediums auf den Regenerationserfolg
- Einfluß der Unterlage auf den Regenerationserfolg.

Eine detaillierte Tabelle der durchgeführten Versuchsvarianten befindet sich im Anhang (Tab. A 2.1).

4.2.2 Kallusstücke

Die in der Literatur beschriebenen Regenerationsversuche über Kallus beziehen sich auf *in vitro* induzierten Kallus an verschiedenen Geweben. MEHRA und SACHDEVA (1979) induzierten Kalluswachstum *in vitro* bei Apfel an Samen, Wurzeln, Blättern, Internodien, Sprossen, Cotyledonen und Embryonen. Aus dem Kallus an Samen, Internodien, Sprossen, Cotyledonen und Embryonen entwickelten sich Sprosse. Hingegen konnten vollständig intakte Pflanzen nicht herangezogen werden. Versuche von SINGHA (1989) ergaben Kallusbildung an internodalen Segmenten von *in vitro* vermehrten *Malus sylvestris*. Die Weiterkultivierung der Kalli führte zu Sproßwachstum.

Für die Versuche 1996 standen *in vivo* gebildete Kalli zur Verfügung. Die beschriebenen Verfahren zur Regeneration über *in vitro* induzierten Kallus dienten als Anhaltspunkte für die durchgeführten Versuche.

Im Herbst 1996 wurde der an den im Frühjahr verletzten Wurzeln *in vivo* gebildete Kallus für Etablierungsversuche *in vitro* geerntet. Es wurden möglichst große Kallusstücke je Versuchsbäumchen (53, 55 und 58) entnommen, um ein Austrocknen des Materials zu vermeiden. Der Transport erfolgte in verschlossenen Gläsern im Wasser. Da der Kallus nach drei bis vier Stunden ohne Weiterbehandlung verbräunte, erfolgte keine Lagerung. TREUTTER (1995) führt die Verbräunung bei Wundkallus auf charakteristische Phenolmuster zurück. Bestimmte Phenole hindern den Kallus am weiteren Wachstum.

Der Kallus wurde am Tag der Ernte aufbereitet. Grobe Verunreinigungen wurden mit einem feuchten Tuch unter Leitungswasser vorsichtig entfernt. Der Kallus wurde mit Hilfe eines Skalpell in Stücke von 0,5 x 0,5 cm geschnitten. Unter laufendem Leitungswasser erfolgte ein „leaching“ für zwei Stunden (siehe Kapitel 4.2.1). Nach einer Alkoholbehandlung (70 %ig, 30 sek.) wurden die Kallusstücke für eine oder drei Minuten mit Quecksilberchlorid (0,2 %ig) desinfiziert. Darauf folgte ein dreimaliges Nachspülen mit sterilem destilliertem Wasser. Alle Varianten wurden zunächst auf einem Medium (Tab. A 2.1.1) mit Zusatz von Aktivkohle

(2g/l) und Ascorbinsäure (100 mg/l) für drei Tage bei 4 °C kultiviert. Als Regenerationsmedium wurde das gleiche, wie in Kapitel 4.2.1 beschriebene, modifizierte MS-Medium verwendet. Als Hormonzusätze wurden TDZ (0,1 %ig oder 0,2 %ig), IBS (0,1 %ig) und GA₃ (0,1 %ig) genutzt. Als Verfestigungsmittel diente Gelrite. Neben der Kultur im Dunkeln (abgedeckte Schale), wurden die Explantate einiger Varianten unter Licht (25 µmol/m² x sec., 16/8 Tag/Nachtrhythmus, 22 (+- 2) °C) zur Regeneration angeregt. Bei Beginn von Kallus- und/oder Sproßbildung erfolgte die weitere Kultivierung unter Lichteinfluß.

Zusätzlich zu den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Parametern wurde der Beginn des Verbräunens der Explantate über die Versuchsdauer beobachtet.

4.2.3 Sprosse

Nach den Regenerationsversuchen über Wurzelschnittlinge standen die Spitzen der gebildeten Sprosse für die *In-vitro*-Kultur zur Verfügung. 1996 wurden Etablierungsversuche für die Sprosse der Unterlagen 53, 55 und 58 durchgeführt. In den Jahren 1997 und 1998 wurden zusätzlich Sprosse der Unterlagen 1, 2, 96, 98 und 101 in die Versuche einbezogen.

4.2.3.1 Etablierung

KRIEGHOFF und HANKE (1994) empfehlen bei Apfelsprossen eine Desinfektion für 1,5 min. mit Quecksilberchlorid (0,2 %ig) und anschließendes dreimaliges Nachspülen mit sterilem destilliertem Wasser. Eine Vorkultur auf einem MS-Medium mit halber Makronährstoffkonzentration und dem Zusatz von Aktivkohle (2 g/l) und Ascorbinsäure (100 mg/l) für drei Tage im Kühlschrank bei 4 °C wird von HANKE (1996) vorgeschlagen. Danach erfolgt die Umsetzung auf frisches Medium.

Die Sproßspitzen der getriebenen Wurzelschnittlinge wurden im Mai des jeweiligen Versuchsjahres im Gewächshaus entnommen. Der Transport erfolgte in mit Wasser gefüllten Gläsern. Die Sprosse wurden auf ca. 1 cm Länge geschnitten. Bis auf die obersten zwei Blätter wurden alle anderen entfernt. Letztere standen für die Regenerationsversuche über Blattsegmente zur Verfügung (Kapitel 4.2.4). Die Sprosse wurden für zwei Stunden unter laufendem Wasser gereinigt („leaching“). Eine Quecksilberbehandlung (0,2 %ig) zur Desinfektion wurde für zwei oder drei Minuten durchgeführt. Die Explantate wurden dreimal mit sterilem destilliertem Wasser nachgespült. Es erfolgte die von HANKE (1996) empfohlene Vorkultur. Bei der Kontrolle wurde auf diese Behandlung verzichtet. Das Etablierungsmedium entsprach dem Vermehrungsmedium. Die Etablierungsversuche wurden in gleicher Weise für die Sproßspitzen der Sorte durchgeführt. Über den Versuchszeitraum wurde der Etablierungserfolg beobachtet, das Auftreten von Pilzen und Bakterien wurde bonitiert.

4.2.3.2 Vermehrung

Apfel-Wildarten und Kultursorten wurden auf einem modifizierten MS-Medium unter Zusatz der doppelten Menge Eisen und 20g/l Sorbitol (als Zuckerquelle) erfolgreich vermehrt. Abhängig von der Wildart oder Sorte wurden als Hormone IBS, BAP und GA₃ in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt (KRIEGHOFF und HANKE 1994).

Die erfolgreich etablierten Sprosse wurden nach dieser Empfehlung zur Vermehrung auf ein modifiziertes MS-Medium (Tab. A 2.2.3) aufgesetzt. Als Hormone wurden 1,0 mg/l IBS und 1,0 mg/l BAP hinzugefügt (Standardmedium 2). Röhren mit Wulstrand (verschlossen mit steriler Aluminiumfolie) dienten als Kulturgefäße. Eine Subkultur umfaßte vier Wochen. Danach erfolgte eine Vereinzelnung der Sprosse und Umsetzung auf frisches Nährmedium. Zur Optimierung der Vermehrung der Unterlagen wurden in den Jahren 1997 und 1998 bei ausreichender Sproßanzahl Versuche mit verschiedenen Medien durchgeführt (Tab. 6). Das einbezogene Material (ausschließlich Sproßspitzen) stammte jeweils aus der 9. Subkultur. Als Kulturgefäße wurden mit einem Plastikdeckel verschlossene Gläser (mit jeweils 5 Sprossen) genutzt. Die Versuchsdauer umfaßte fünf Subkulturen und der Versuchsumfang betrug jeweils 50 Sprosse der einzelnen Unterlagen.

Tab. 6: Zusammensetzung der Medien zur Optimierung der Sproßvermehrung *in vitro* für die Unterlagen 53, 55, 58, 1 und 2 (1997)

Tab. 6: Ingredients of the media for optimization the shoot propagation in vitro for the rootstocks 53, 55, 58, 1 and 2 (1997)

Medium	Hormonzusätze ¹
1	1,0 mg / l BAP
2	1,0 mg / l BAP / 1,0 mg / l IBS
3	0,5 mg / l BAP / 0,5 mg / l GA ₃ / 0,2 mg / l IBS

¹ = nach KRIEGHOFF und HANKE (1994)

Im Wachstumsraum wurden die Sprosse bei 25 µmol/m² x sec. (Weißlicht), einem 16/8 Tag-Nacht-Rhythmus und 22 (+ 2) °C zur Vermehrung angeregt.

Je Subkultur wurde die durchschnittliche Anzahl gebildeter Sprosse und die durchschnittliche Sproßlänge in Abhängigkeit vom verwendeten Mediums ermittelt. Eine statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des KRUSKAL-WALLIS-Testes und der anschließende Vergleich der Mittelwerte mit dem U-Test von MANN und WHITNEY (KÖHLER et al. 1992), beide mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,05. Die Sprosse wurden auf Bakterien- und Pilzbefall bonitiert.

4.2.3.3 Bewurzelung und Akklimation

Die Bewurzelung *in vitro* vermehrter Sprosse ist *in vivo* und *in vitro* möglich. WEBSTER und JONES (1989) bewurzelten *in vitro* vermehrte Sprosse der Unterlage M9 erfolgreich im Gewächshaus unter unsterilen Bedingungen. HANKE et al. (1991) bevorzugten für Apfelsprosse die Bewurzelung *in vitro*. Nach einer 10tägigen Phase auf einem modifizierten MS-Medium mit halber Makronährstoffkonzentration und Zusatz von 3 mg/l IBS im Dunkeln, wurden die Sprosse auf ein hormonfreies Medium umgesetzt. Die weitere Kultur erfolgte unter Licht.

Entsprechend wurden die Sprosse der Unterlagen (15 bis 20 mm lang) 1997 und 1998 zur Bewurzelung aufgesetzt. Dem Medium (Tab. A 2.2.4) wurde 1997 entweder Agar (SERVA, Kobe 1) oder Gelrite (ROTH), 1998 ausschließlich Agar als Verfestigungsmittel zugesetzt (Tab. 7). Je Versuch wurden 30 Sprosse einbezogen.

Tab. 7: Bewurzelungs- und Akklimationstermine (1997 und 1998)

Tab. 7: Time of rooting and acclimatization (1997 and 1998)

Bewurzelungsbeginn mit Hormonen	Bewurzelungsbeginn ohne Hormone	Unterlage	aus Subkultur	Verfestigungsmittel		Akklimationserfolg
				mit Hormonen	ohne Hormone	
20.02.1997	02.03.1997	55, 58	7	Agar	Agar	02.04.1997
17.03.1997	27.04.1997	55, 58	8	Agar	Agar	27.05.1997
24.04.1997	04.05.1997	55, 58	9	Gelrite	Gelrite	02.07.1997
24.04.1997	04.05.1997	53, 55, 58	9	Gelrite	Agar	02.07.1997
11.05.1998	21.05.1998	55, 58	18	Agar	Agar	18.06.1998
		1, 2	9			
29.06.1998	09.06.1998	55, 58	19	Agar	Agar	05.08.1998
		1, 2	10			
14.08.1998	24.08.1998	55, 58	20	Agar	Agar	21.09.1998
		1, 2	11			

Nach vier Wochen auf hormonfreiem Medium war die Bewurzelung abgeschlossen und die Sprosse wurden den Kulturgefäßen entnommen. Reste des Verfestigungsmittels wurden mit Wasser abgespült. Die Anzahl bewurzelter Sprosse wurde ermittelt sowie die Anzahl gebildeter Wurzeln je Sproß gezählt und die Wurzellänge der einzelnen Wurzeln gemessen. Die bewurzelten Sprosse wurden in flache Schalen in ein Gemisch aus Torf/Sand/Perlite (3:1:1) pikiert. Die weitere Kultur erfolgte unter schattierter Polyethylenfolie (farblos, Stärke: 0,040 mm). Mit Hilfe eines Fog-Systems (BONECO ASTORIA Typ 7030) wurde die rLF zwischen 80 und 90 % gehalten. Nach zwei Wochen begann die stufenweise Abhärtung der bewurzelten Sprosse, die nach weiteren vier Wochen abgeschlossen war. Der Akklimationserfolg wurde bezogen auf die Anzahl bewurzelter Sprosse (Akklimationserfolg I) und bezogen auf die Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse (Akklimationserfolg II) ermittelt. Die statistische Auswertung der Bewurzelungs- und Akklimationserfolges wurde mit Hilfe des χ^2 - Tests durchgeführt. Zudem wurde die Wurzellänge und die Wurzelanzahl

ermittelt. Mit Hilfe des KRUSKAL-WALLIS-Testes und dem anschließenden Vergleich der Mittelwerte mit dem U-Test von MANN und WHITNEY (KÖHLER et al. 1992) - beide mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ - wurden diese Ergebnisse statistisch verrechnet. Bei der Auswertung wurde untersucht, ob ein Einfluß des verwendeten Verfestigungsmittels und des Bewurzelungstermins festgestellt werden konnte.

Im Versuchsjahr 1998 wurden einige Sprosse der Bäume 1 und 2 aus der neunten Subkultur *ex vitro* bewurzelt. Die unbewurzelten Sprosse aus der Vermehrung wurden mit 1 %igem IBS (Trägermedium : Talkum) behandelt und direkt in das oben beschriebene Substrat gesteckt. Alle weiteren Kulturbedingungen unterschieden sich nicht von den oben genannten.

Die bis zum 31. Juli des jeweiligen Versuchsjahres akklimatisierten Sprosse wurden im Freiland in ein Grundbeet unter einem Folienzelt (Polyethylenfolie, Stärke: 0,040 mm, farblos, schattiert) ausgepflanzt und stufenweise abgehärtet. Die nach dem 1. August akklimatisierten Pflanzen wurden getopft und im Gewächshaus weiterkultiviert. Ein Auspflanzen in das Grundbeet hätte zur Folge gehabt, daß diese Pflanzen ihr Wachstum bis zum Vegetationsende nicht ausreichend abgeschlossen hätten.

Im Frühjahr des jeweils folgenden Versuchsjahres wurden die *in vitro* vermehrten und akklimatisierten Pflanzen im Freiland aufangepflanzt. Einige der Regenerate standen als Mutterpflanzen für die Stecklingsvermehrung und als Unterlagen für Veredlungen zur Verfügung.

4.2.4 Blattsegmente

THEILER-HEDTRICH und THEILER-HEDTRICH (1990) erzielten eine Sproßbildung an Blattsegmenten von verschiedenen Apfelunterlagen und -sorten auf unterschiedlichen Medien (MS, N6, WPM) unter Zusatz von TDZ (0,2 mg/l), BAP (5,0 mg/l), IBS (0,1 oder 0,2 mg/l) und 2,4 D (0,1 oder 0,2 mg/l). HANKE et al. (1991) zeigten, daß die beste Sproßbildung aus Blattsegmenten verschiedener Unterlagen und Sorten bei Apfel auf einem modifizierten MS-Medium (halbe Makronährstoffkonzentration) unter Zusatz von TDZ (0,1 mg/l) erreicht wurde. Die Blätter wurden, entlang der Mittelrippe, in unterschiedlich lange Stücke geschnitten und mit der Blattoberseite auf die verschiedenen Nährmedien gelegt. Die Kultivierung der Explantate erfolgte zunächst für zwei Wochen im Dunkeln mit anschließender Lichtphase.

Die bei der Etablierung der Sprosse (Unterlagen 53, 55, 58) 1996 angefallenen Blätter wurden für die Regenerationsversuche über Blattsegmente *in vitro* genutzt. Die Explantate wurden zwei Stunden unter laufendem Leitungswasser gereinigt („leaching“). Anschließend erfolgte eine Desinfektion mit Quecksilberchlorid (0,2 %ig) für drei Minuten. Die Explantate wurden dreimal mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Blätter unter sterilen Bedingungen in Rechtecke der Größe 2 x 4 mm (ca. 8 mm²) geschnitten. Als Kulturgefäße dienten Röhrchen mit Wulstrand mit 10 ml Nährmedium. Je Röhrchen wurden 4 Explantate

mit der oberen Blattepidermis auf das Medien aufgelegt. Nach einer dreitägigen dunklen Kühlphase auf einem modifiziertem MS-Medium (Tab. A 2.2.2) mit Aktivkohle- und Ascorbinsäurezusatz erfolgte ein Umsetzen auf das Regenerationsmedium. Hierbei handelte es sich um ein modifiziertes MS-Medium (Tab. A 2.2.5) mit Zusatz von TDZ (0,1 mg/l), IBS (0,1 mg/l) und GA₃ (0,1 mg/l). Nach zweiwöchiger Kultur im Dunkeln wurden die Explantate unter Lichteinfluß (16 h Photoperiode) bei 22 (+- 2) °C zur Regeneration angeregt. Die erste Subkultur umfaßte sechs Wochen, alle folgenden vier Wochen.

Der Beginn von Kallus- und Sproßwachstum wurde während der Versuchsdauer beobachtet. Der Ort der Kallusinduktion und die Kallusgröße wurden bonitiert (Tab. A 2.3.1 und Tab. A 2.3.2).

Da die Ergebnisse des Jahres 1996 nicht befriedigend waren, wurde auf eine weitere Durchführung dieser Methode zur Regeneration in den folgenden Versuchsjahren verzichtet.

dreimal mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Blätter unter sterilen Bedingungen in Rechtecke der Größe 2 x 4 mm (ca. 8 mm²) geschnitten. Als Kulturgefäße dienten Röhrchen mit Wulstrand mit 10 ml Nährmedium. Je Röhrchen wurden 4 Explantate mit der oberen Blattepidermis auf das Medien aufgelegt. Nach einer dreitägigen dunklen Kühlphase auf einem modifiziertem MS-Medium (Tab. A 2.2.2) mit Aktivkohle- und Ascorbinsäurezusatz erfolgte ein Umsetzen auf das Regenerationsmedium. Hierbei handelte es sich um ein modifiziertes MS-Medium (Tab. A 2.2.5) mit Zusatz von TDZ (0,1 mg/l), IBS (0,1 mg/l) und GA₃ (0,1 mg/l). Nach zweiwöchiger Kultur im Dunkeln wurden die Explantate unter Lichteinfluß (16 h Photoperiode) bei 22 (+- 2) °C zur Regeneration angeregt. Die erste Subkultur umfaßte sechs Wochen, alle folgenden vier Wochen.

Der Beginn von Kallus- und Sproßwachstum wurde während der Versuchsdauer beobachtet. Der Ort der Kallusinduktion und die Kallusgröße wurden bonitiert (Tab. A 2.3.1 und Tab. A 2.3.2).

Da die Ergebnisse des Jahres 1996 nicht befriedigend waren, wurde auf eine weitere Durchführung dieser Methode zur Regeneration in den folgenden Versuchsjahren verzichtet.

4.3 Bewertung der regenerierten Unterlagen

Zur Unterscheidung der Regenerate der Unterlagen der verschiedenen Versuchsbäume wurden morphologische Merkmale bonitiert und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Verfahren sollte außerdem festgestellt werden, ob es sich bei den alten Apfelbäumen um Veredlungen handelt oder ob sich die Sorte im Laufe der Zeit von der Unterlage freigemacht hat und auf eigener Wurzel steht. Sollte letztere Annahme zutreffen, müßten die regenerierten Unterlagen mit der Sorte morphologisch und genetisch übereinstimmen. Zur Überprüfung des Virusstatus wurde ein ELISA-Test durchgeführt.

4.3.1 Morphologische Untersuchungen

Für die Bonitur standen Regenerate der Unterlagen 1, 2, 53, 55 und 58 zur Verfügung. Alle Pflanzen waren mit Hilfe der Wurzelschnittlingsmethode (1996 und 1997) regeneriert wurden. Der Stichprobenumfang der einzelnen Regenerate war unterschiedlich (Tab. 8). Von der Sorte wurde ebenfalls eine unterschiedliche Anzahl an Pflanzen (Unterlage: Bittenfelder) bonitiert. Da generative Merkmale auf Grund des Alters der Regenerate für die Bonitur nicht zur Verfügung standen, konnten ausschließlich vegetative Merkmale zur Beurteilung herangezogen werden. Im Anhang A3 befindet sich das hierfür entwickelte Boniturschema.

Tab. 8: In die Bonituren einbezogene Regenerate der Unterlagen 1, 2, 53, 55 und 58 sowie Pflanzen der Sorte der Bäume 53, 55 und 58 (1997)

Tab. 8: Regenerated rootstocks (1, 2, 53, 55 and 58) and trees of the cultivar (53, 55 and 58) used for taking up morphological characters (1997)

Regenerate der Unterlagen	Anzahl bonitierter Pflanzen	Anzahl bonitierter Blätter
1	13	39
2	40	120
53	5	15
55	49	147
58	3	15
Sorten der Bäume	Anzahl bonitierter Pflanzen	Anzahl bonitierter Blätter
53	11	33
55	13	39
58	9	27

Anhaltspunkte boten Merkmalszusammenstellungen von REMMY und GRUBER (1993), WAGNER (1996), BÜTTNER (1997), die Richtlinien des internationalen Verbandes zum Schutz von Pflanzzüchtungen „UPOV“ (ANONYM 1992) und FITSCHEN (1990). Es wurden die Merkmale bonitiert, die in der Literatur als aussagekräftig empfohlen werden. Auf Messungen wurde verzichtet, da das zur Verfügung stehende Material eine sehr geringe Größe hatte.

Folgende Merkmale wurden zur Unterscheidung herangezogen:

- Blattform, Blattspitze, Blattrand
- Drüsen am Blattrand
- Behaarung
- Nebenblätter.

Es wurden jeweils die untersten drei Blätter in die Bonituren einbezogen. Die Bonitur erfolgte im August 1997. Die absoluten und prozentualen Anteile der einzelnen Boniturnoten je Merkmal wurden mit Hilfe von Kreuztabellen errechnet. Die Eignung der einzelnen Merkmale zur Unterscheidung von Sorten und Unterlagen einerseits und der Unterlagen untereinander wurde bewertet.

4.3.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Um Identität oder Verschiedenheit der Unterlagen der Versuchsbäume auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurden molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchungen setzten sich aus der Isolierung der DNA, der Konzentrationsbestimmung der DNA und der Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe der RAPD-Technik unter Anwendung der PCR - Methode (Polymerase Chain Reaction) zusammen. Die anschließend

durchgeführte Gelelektrophorese führte zu Fingerprints, deren Banden unter UV-Licht sichtbar wurden. Die Bandenmuster der Regenerate wurden fotografiert und ausgewertet.

Die Regenerate der Unterlagen 53, 55 und 58 wurden 1996 und die der Unterlagen 1 und 2 im Versuchsjahr 1997 in die Untersuchungen einbezogen. Die Versuche wurden am Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden-Pillnitz durchgeführt. 1998 wurden die Regenerate aller Unterlagen in die Untersuchungen einbezogen; zusätzlich drei Herkünfte von *Malus sylvestris* [3,07 (Eichelborn), 3,10 (Buttstätt), OW 5 (Oberwartha 5)]. Letzteres Blattmaterial wurde vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Genbank Obst in Dresden-Pillnitz zur Verfügung gestellt. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte im Institut für Zierpflanzenzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Ahrensburg.

4.3.2.1 DNA-Isolierung

Voraussetzung für Untersuchungen auf Grundlage der DNA ist deren Isolierung. 1996 erfolgte die Isolierung mit Hilfe eines modifizierten Protokolls (SCHREIBER 1996) zur RAPD-Mini-Prep Methode nach EDWARDS (1991). Diese Methode führt zur Isolierung sämtlicher DNA und RNA. Zwei bis drei Gramm frisches Blattmaterial wurde den Proben (getrennt nach Unterlagen) entnommen. 20 mg Polyclar-AT und 400 µl Extraktionspuffer wurden hinzugegeben. Der Puffer setzte sich aus 200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA.Na₂ (pH 8.0), 0,5 % SDS und 10 mM 2-Mercaptoethanol zusammen. Die Blätter wurden mit Hilfe eines Rührers zerkleinert und die Lösung homogenisiert. Nach Zugabe von 400 µl Extraktionspuffer und vorsichtigem Schütteln der Proben wurden diese eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dieser Zeit wurden die Proben bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für zwei Minuten bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß abpipettiert. Nach Zugabe von 0,8 Vol % Isopropanol erfolgte ein vorsichtiges Mischen, bis die DNA als Niederschlag sichtbar war. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14 000 rpm für zwei Minuten bei 4 °C wurde der Überstand abpipettiert. Die gefällte DNA befand sich im unteren Bereich des Probengefäßes als Pellet. Durch die Zugabe von 70 %igem Ethanol (- 20 °C) wurden die Pellets gereinigt. Nach vorsichtigem Schütteln per Hand und einer anschließenden Zentrifugation für fünf Minuten bei 14 000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abpipettiert. Danach erfolgte eine Trocknung der Pellets in einer Vakuumzentrifuge für 20 Min.. Die isolierte DNA wurde in 100 µl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen und in ein sauberes Probengefäß überführt. Bis zur weiteren Aufbereitung erfolgte die Lagerung im Kühlschrank (4 °C).

Im Versuchsjahr 1997 wurde eine von SCHREIBER (1997) modifizierte Methode zur Isolierung der DNA nach CLARK (1997) durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß die DNA gereinigt von der RNA isoliert wird. RNA-Rückstände, wie sie bei der RAPD-Mini-

Prep- Methode auftreten, können die Auswertung der Fingerprints erschweren, da beispielsweise eine Verzerrung des Bandenmusters nicht ausgeschlossen werden kann.

Zwei Gramm des frischen Blattmaterials (ohne Stiel und Mittelrippe) wurden je Probe entnommen. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff übergossen und gemörsert. Der Extraktionspuffer war wie folgt zusammengesetzt: 55 ml CTAB-Lösung (5 g CTAB, 70 ml 5M NaCl, 25 ml 1M Tris-HCl (pH 7.0), 0,5 M EDTA (pH 8.0), 550 mg PVP und 550 µl Mercaptoethanol. In einem Wasserbad wurde der Puffer bei 65 °C aufbewahrt. Zu den gemörserten Blättern wurden 5 ml des Puffers hinzugegeben und homogenisiert. Die Proben wurden für eine Stunde im Wasserbad gehalten. Nach dieser Zeit erfolgte ein Abkühlen auf Raumtemperatur. Zu den Probelösungen wurden 7 - 8 ml Chloroform hinzugegeben und für 10 Min. in einem Überkopfschüttler gemischt. Nach einer anschließenden Zentrifugation von 10 Min. bei 4 500 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Probengefäß gegeben. Die RNase wurde erwärmt und 50 µl zu jeder Probe hinzugegeben. Darauf folgte eine Aufbewahrung für eine halbe Stunde im Wasserbad (37 °C). Anschließend wurden 5 ml Chloroform je Probe hinzugegeben. Nach dem Mischen für 10 Min. im Überkopfschüttler wurden die Proben für 10 Min. bei 4 500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Zur Fällung des CTAB's wurden jeweils 3 ml Isopropanol hinzugegeben. Nach 10 Min. im kalten Wasserbad (4 °C) wurden die Proben vorsichtig per Hand geschüttelt. Die isolierte DNA fiel in langen Fäden aus. Sie wurde vorsichtig mit Hilfe eines Glasstabes aus der Lösung genommen und in einen neuen Probebehälter gegeben. Nach Zugabe von 3 ml eines Waschpuffers (5 ml 76 %iges wässriges Ethanol und 0,2 M Natriumacetat) wurden die Proben für 20 Min. im kalten Wasserbad aufbewahrt. Der Waschpuffer wurden abgesogen und 3 ml 70 %iges Ethanol hinzugegeben. Nach dem Überkopfschütteln für fünf Minuten wurden die Proben für fünf Min. bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig abgegossen und die Probebehälter auf den Kopf zum Trocknen gestellt. Die Pellets saßen fest im unteren Bereich der Behälter. Danach erfolgte eine Trocknung der Pellets in einer Vacuumzentrifuge für 20 Min.. Die DNA wurde mit 200 µl TE-Puffer (Tris-HCl, pH 8.0 und EDTA) aufgenommen. Die Lagerung der DNA erfolgte im Kühlschrank (4 °C).

Die DNA der Regenerate wurde 1998 nach einem Protokoll von DOYLE und DOYLE (1990) modifiziert von DUNEMANN (1998) isoliert. 150 mg des frischen Blattmaterials je Probe wurden in einem Reaktionsgefäß abgewogen und zwei in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Mahlkugeln jeder Probe hinzugegeben. Die Proben wurden für fünf Min. mit einer Schwingmühle gemahlen. Danach erfolgte die Zugabe von 700 µl Extraktionspuffer (2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8.0, 1 % PVP-40), vorgewärmt auf 65 °C im Wasserbad. Einer Variante je Probe wurde je 1 % 2-Mercaptoethanol zugesetzt, die Kontrolle erhielt diesen Zusatz nicht. Es folgte eine Inkubation für 30 Min. im Wasserbad unter mehrmaligem Schütteln. Zur Extrahierung der DNA wurden 700 µl einer Lösung aus Chloroform und Isoamyl (1:1) je Probe hinzugegeben. Nach der Zentrifugation für fünf Min. mit 4 000 rpm bei Zimmertemperatur wurde die Oberphase (ca. 300 - 400 µl) abgenommen. Zur Fällung der DNA (eine halbe Stunde bei Raumtemperatur) wurde 0,7 Vol % eiskaltes Isopro-

panol hinzugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 8 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesogen. Die Lösung der DNA-Pellets erfolgte in 100 µl TE-Puffer bei 4 °C über 24 Stunden. Zur Beseitigung der RNA wurde 3 µl RNase für eine Stunde bei 37 °C (Wasserbad) zu den Proben gegeben. Es folgte eine weitere Fällung der DNA in einer Lösung aus 1/10 Vol. 3M Natriumacetat und 2 Vol% Ethanol für 1 Stunde bei -80 °C. Nach der Zentrifugation für 20 Min. bei 14 000 rpm und Zimmertemperatur wurde der Überstand abgenommen. Zur Auswaschung der Pellets wurden 500 µl 70 %iges Ethanol je Probe hinzugegeben. Die Proben wurden für drei Min. bei 13 000 rpm und Zimmertemperatur zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert. Die DNA-Pellets wurden in 100 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen und im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

4.3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

1996 und 1997 wurden pro DNA-Analyse 100 ng DNA benötigt. Dies entspricht ca. 20 ng/µl. Um die Konzentration der isolierten DNA der Unterlagen zu bestimmen, wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgebracht (siehe Kapitel 4.3.2.4). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe von Markern, die eine bestimmte DNA-Konzentration nach einer Gelelektrophorese charakterisierten. Entsprechend der festgestellten Konzentration wurde die notwendige Menge der Ausgangslösung für die Analysen festgesetzt. Wenn notwendig, wurde nach einer Verdünnung eine Arbeitslösung hergestellt.

Im Versuchsjahr 1997 wurde die Konzentrationsmessung neben der oben beschriebenen Methode mit Hilfe eines DyNA-Quant-Meßgerätes durchgeführt. Nach Zugabe eines Farbstoffes zu den DNA-Proben fluoresziert die DNA-Farbstoffkombination unter UV-Licht. Die Intensität der Farbreaktion spiegelt die Konzentration der DNA-Lösung wider. Als Standard wurde eine Thymus-DNA-Lösung eingesetzt. Die Arbeitslösung für die Untersuchungen wurde hergestellt.

Im Versuchsjahr 1998 wurde die gewünschte DNA-Konzentration je Probe auf 10 ng/µl festgesetzt. Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Tropfentestes und einer Gelelektrophorese. Für den Tropfentest bestand die Arbeitslösung I bei jeder Probe aus 2 µl DNA-Lösung und 8 µl sterilem bidestilliertem Wasser. Die Arbeitslösung II setzte sich aus 1 µl Arbeitslösung I, 8 µl sterilem bidestilliertem Wasser und 1 µl Ethidiumbromid (EB) zusammen. Als Referenz dienten Lösungen mit 0, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 ng/µl DNA. Die Auswertung erfolgte über UV-Licht (siehe Kapitel 4.3.2.4). Ein Streifen Parafilm wurde über einigen Tropfen destilliertem Wasser auf einer Glasplatte über einer UV-Lichttröhre ausgerichtet und glattgestrichen. 10 µl der Arbeitslösung II je Probe und der Referenzlösungen wurden in festgesetzter Reihenfolge in Tropfenform auf den Parafilmstreifen aufgebracht. Die Konzentration der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Programmes 'Molecular Analyst' für Biorad's Gel-Imager festgestellt.

Für die Gelauswertung wurde eine Arbeitslösung aus 1 µl Ladepuffer, 9 µl destilliertem Wasser und 1 µl DNA-Lösung je Probe hergestellt. Nach der Elektrophorese bei 80 Volt für drei Stunden erfolgte die Auswertung anhand der Banden und deren Farbintensität. Die Quantifizierung mit Hilfe des Gels ist immer in Zusammenhang mit dem Tropfentest auszuwerten. Beide zusammen bilden die Grundlage für die Erstellung der Verdünnungsreihe und damit für die Erstellung der Arbeitslösung (10 ng DNA je µl) für die PCR.

4.3.2.3 DNA-Vervielfältigung

Die Auswahl der Primer erfolgte 1996 und 1997 aus Ergebnissen vorangegangener Versuche bei Apfel von SCHREIBER (1996, 1997), im Versuchsjahr 1998 nach Ergebnissen von DUNEMANN (1998). Insgesamt wurden 31 verschiedene Primer mit einer unterschiedlichen Anzahl Nucleotide eingesetzt (Tab. A 4.1). Im Versuchsjahr 1996 und 1997 wurden 10mer Primer der Firma Roth (Karlsruhe) und der Operon Technologies (Alameda, USA), genutzt. Auf Grund der größeren Spezifität kamen 1998 20mer Primer der Firma Eurogenetec, Seraining, Belgien zur Anwendung (DUNEMANN 1998). Diese Primer wurden von DEBENER und MATTHIESCH (1998) sequenziert.

Die Lösung (25 µl) für die PCR-Untersuchungen setzte sich wie folgt zusammen:

- 1996 und 1997: 100 ng DNA, 0,2 µM Primer, je 100 µM der dNTP's und 0,5 Einheiten Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) in 0,5-fach konzentriertem Puffer nach WILLIAMS et al. (1990), aufgefüllt mit sterilem bidestilliertem Wasser.
- 1998: 25 ng DNA, 0,4 µM Primer, je 100 µM der dNTP's und 1 Einheit Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) in einfach konzentriertem Puffer nach WILLIAMS et al. (1990), aufgefüllt mit sterilem bidestilliertem Wasser.

Es wurden zunächst sogenannte Pools je Primer erstellt, die alle Bestandteile außer die benötigte DNA enthielten. Die Pools wurden auf die Gefäße für die PCR-Analyse aufgeteilt. 5 µl DNA (1996, 1997) oder 2,5 µl DNA (1998) der zu untersuchenden Unterlage wurden je Primer hinzugegeben. Zu jeder Probe erfolgte die Zugabe von 25 µl Öl (1996, 1997) oder 1 µl Öl (1998).

Die Durchführung der PCR erfolgte in den ersten beiden Versuchsjahren in einem Easy Cycler (ERICOMP TWIN BLOCK SYSTEM TM) nach folgendem Programm:

- Zyklus 1: 5 Min. bei 94 °C, 0,5 Min. bei 35 °C, 2 Min. bei 72 °C
- Zyklus 2-4: 40 Sek. bei 93 °C, 30 Sek. bei 35 °C, 2 Min. bei 72 °C
- Zyklus 5-15: 30 Sek. bei 93 °C, 30 Sek. bei 35 °C, 2 Min. bei 72 °C
- Zyklus 16-26: 40 Sek. bei 93 °C, 30 Sek. bei 35 °C, 2 Min. bei 72 °C
- Zyklus 27-29: 50 Sek. bei 92 °C, 30 Sek. bei 35 °C, 2 Min 30 Sek. bei 72 °C
- Zyklus 30: 1 Min. bei 92 °C, 30 Sek. bei 35 °C, 5 Min. bei 72 °C.

Im Versuchsjahr 1998 wurde für die PCR-Reaktionen das Gerät Hybaid Omnigene genutzt. Das Programm setzte sich wie folgt zusammen:

- Zyklus 1: 5 Min. bei 94 °C
- Zyklus 2-39: 30 Sek. bei 94 °C, 1 Min. bei 55 °C, 2 Min. bei 72 °C
- Zyklus 40: 30 Sek. bei 94 °C, 1 Min. bei 55 °C, 7 Min. bei 72 °C.

4.3.2.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mittels einer Gelelektrophorese nach SAMBROOK et al. (1989). 1,2 g Agarose (Biometra) wurden 1996 und 1997 in 100 ml TBE-Puffer (10fach konzentriert) gelöst. 1998 wurden 1,5 g Agarose der Firma peqLab biotechnology GmbH auf 100 ml TBE-Puffer genutzt. Die Agarose wurde unter Erhitzen gelöst. Je 100 ml Puffer wurde in den ersten beiden Versuchsjahren 1 µl EB hinzugegeben. 1998 wurden 5 µl EB je 100 ml Puffer zugesetzt. Die Lösung wurde in die vorgesehene Halterung gegossen und die Kämme, die die Taschen für die Proben formten, hinzugesetzt. Nach Abkühlung des Gels wurden die Kämme vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammern wurden soweit mit TBE-Puffer (5fach konzentriert) gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Den einzelnen Proben wurde 2,5 µl Bromphenolblau zur Färbung zugesetzt. In die Taschen des Gels wurden 18 - 20 µl jeder Probe pipettiert. Zur späteren Charakterisierung der Banden wurde in die äußeren Taschen des Gels ein Marker (100 bp DNA Ladder von GIBCOBRL, LifeTechnologies) gegeben. Dieser definiert Bereiche mit einer bestimmten Anzahl Basenpaaren. Das Gel wurde an einem Voltmeter bei 70 Volt (1996, 1997) und 110 Volt (1998) angeschlossen. Nach drei Stunden war die Trennung der Fragmente abgeschlossen. Die Gele wurden unter UV-Licht mit Hilfe des Computerprogrammes 'Molekular Analyst' für Biorad's Gel-Imager fotografiert und dokumentiert.

Zur weiteren Auswertung wurden die amplifizierten DNA-Stücke herangezogen, die charakteristische Banden ergaben. Diese Banden spiegelten den Polymorphismus der Unterlagen wieder. Die Auswertung erfolgte 1996 und 1997 visuell. Gleichheit und Ungleichheit der Proben wurden je Primer festgestellt und zusammenfassend ausgewertet. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Bande wurde 1998 mit 1 oder 0 kodiert. Die Auswertung erfolgte durch eine Clusteranalyse (auf Basis des Jaccard-Koeffizienten, ungewichtete Gruppenmethode mit arithmetischem Mittelwert) mit Hilfe des Programmpaketes NTSYS-pc (Version 1.70, ROHLF 1993). Es wurde ein Dendrogramm erstellt.

4.3.3 Virustestung

Die Untersuchungen zum Virusstatus der Regenerate wurden 1998 am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

In die Testung wurden die Regenerate der Unterlagen 1, 2, 53, 55 und 58 einbezogen. Diese Pflanzen waren mit Hilfe der Wurzelschnittlingsmethode (Kapitel 4.1.1) regeneriert worden. Die obersten drei Blätter von fünf Pflanzen und Triebstücke der gleichen Unterlage wurden am Vorabend des Testtages (10.06.1998) geerntet und in feuchtes Filterpapier eingeschlagen. Es erfolgte eine Untersuchung auf das Chlorotische Apfelblatflecken-Virus (apple chlorotic leaf spot virus, CLSV), das Apfelstammfurchungs-Virus (apple stem grooving virus, SGV) und das Apfelmosaik-Virus (ApMV). Die Testung wurde sowohl für die Blätter (B) als auch für die Triebstücke (T), je zweifach wiederholt, durchgeführt. Als Testmethode kam eine Simultanmethode des double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) nach FLEGG und CLARK (1979) zur Anwendung. Zur Aufbereitung des Materials wurden 50 g der Blätter und 30 g der Triebstücke abgewogen. Als Kontrolle wurde Material infizierter und gesunder Gurkenpflanzen verwendet. Diese Antigene standen in gefriergetrocknetem Zustand zur Verfügung. Die praktische Durchführung des Testes erfolgte in Anlehnung an RICHTER et al. (1977, 1979). Die Antisera, in denen sich die Antikörper der zu untersuchenden Viren befanden, wurden vom Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz zur Verfügung gestellt.

1. Coating (Adsorbieren der Antikörper an die Trägeroberfläche)

Die Antikörper der zu untersuchenden Viren wurden mit einem Coatingpuffer (0,080g Na_2CO_3 + 0,147 g NaHCO_3 in 50 ml Aqua dest., pH. 9.6) im Verhältnis 1 : 1000 verdünnt. In jedes Nöpfchen der Testplatte wurden 200 μl der verdünnten Antikörper-Pufferlösung pipettiert und gekennzeichnet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für drei Stunden. Die Testplatten wurden dreimalig mit PBS (gepufferte Kochsalzlösung) + 0,05 %igem Tween 20 gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Die PBS-Lösung bestand aus 8,0 g/l NaCl + 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 g/l KH_2PO_4 + 0,2 g/l KCl + 0,2 g/l NaN_3 , pH-Wert 7.4. Der Zusatz von Tween 20 dient der Herabsetzung der Oberflächenspannung. Die Antikörper haften nach dieser Behandlung an der Oberfläche der Nöpfchen. Nach Zugabe der Virusprobe binden sie die entsprechende Antigene aus der zu untersuchenden Lösung, es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex.

2. Aufbereitung der Pflanzenproben

Zu den Blattproben wurde 5 ml, zu den Stengelproben 3 ml PBS-Tween + 2 % PVP (Polyvinylpyrrolidon) gegeben. Das PVP dient dazu, die Aggregatbildung zwischen den Viruspartikeln und den hochmolekularen Pflanzeninhaltsstoffen zu unterbinden, damit die Viruspartikel in Lösung bleiben. Die Proben wurden gemörsert und bei 6 000 rpm für 15 Min. zentrifugiert. Die Antigene der Proben standen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

3. Aufbringen des Konjugates auf die Testplatten

Das Konjugat besteht aus einem enzymmarkierten Antikörper des jeweiligen Virus. Als Enzym kam eine alkalische Phosphatase zur Anwendung. Diese Antikörper binden an freie Determinanten der zu untersuchenden Antigene. Die Zugabe ist für den Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes notwendig. Es wird ein Antikörper-Antigen-enzymmarkierter Antikörper-Komplex gebildet. Das Konjugat wird mit einer PBS-Tween 20-Lösung, versetzt mit 2 % PVP und 0,2 % Rinderserumalbumin (RSA) auf ein Verhältnis von 1 : 1000 verdünnt. Von dieser Lösung werden 100 µl in jedes Nöpfchen pipettiert.

4. Zugabe des Pflanzenextraktes

Von den zentrifugierten Probelösungen werden 100 µl in jedes Nöpfchen zum Konjugat hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Es wird der unter Punkt 3 beschriebene Komplex gebildet. Nach der Inkubationszeit wurden die Testplatten fünfmal mit einer Lösung aus PBS und Tween 20 (pH 7.4) gewaschen und auf Filterpapier getrocknet.

5. Zugabe des Enzymsubstrates

Für den Nachweis des unter Punkt 3 erwähnten Antikörper-Antigen-enzymmarkierten Antikörper-Komplexes ist die Zugabe eines geeigneten Enzymsubstrates notwendig. Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in einem Substratpuffer (97 ml Diethanolamin + 800 ml Aqua. dest. + 0,2 g NaN₃, pH-Wert 9.8) verwendet. Je Nöpfchen wurden 200 µl des Substrates pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur für eine Stunde. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl NaOH (2n) abgebrochen. Die Reaktion war in Form eines Farbumschlages sichtbar. Das Enzymsubstrat wird durch die alkalische Phosphatase in Phosphat und das gelbgefärbte p-Nitrophenol gespalten. Die Viruskonzentration spiegelt sich in der Intensität der Gelbfärbung wieder.

6. Messen der Farbreaktion

Die Intensität der Farbreaktion wurde mit einem Spektralphotometer (Microplate Autoreader von Bio-Tec-Instrument) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Extinktionswerte über 0,1 charakterisierten eine Virusinfektion. Die gewonnenen Daten wurden tabellarisch aufbereitet.

4 Material und Methoden

Im Rahmen des Projektes wurden acht repräsentative Obstbäume der Gattung *Malus* aufgrund ihres hohen Alters und ihrer Vitalität ausgewählt. Die Bäume stehen an einem Feldweg zwischen Tempelberg und Gölsdorf in der Nähe von Müncheberg (Landkreis Märkisch-Oderland, 50 km östlich von Berlin, Abb. A 1.1). Sie stammen aus einer Pflanzung von 1804. Dies geht aus der Chronik des Grafen von Hardenberg hervor, dessen Familie in langer Tradition die umliegenden Flächen ackerbaulich nutzt (HARDENBERG 1996). Die Bäume werden der Vitalitätsstufe 0 und 1 (Schädigungsgrad 0 bis 25 %) zugeordnet (FORSCHUNGSGESELLSCHAFT LANDSCHAFTSENTWICKLUNG, LANDSCHAFTSBAU 1993). Die Stammumfänge in 1,20 m Höhe betragen zwischen 2,50 und 3,0 m. Die Gesamthöhen liegen zwischen fünf und sieben Metern.

Bei der Sorte handelt es sich bei allen acht Bäumen um die 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' (SCHWÄRZEL 1996), die Unterlagen sind unbekannt. Die Veredlungsstelle der Versuchsbäume ist nicht eindeutig zu erkennen. Die Regenerationsversuche der Unterlagen wurden deshalb auf den Wurzelraum beschränkt. Das Wurzelsystem der Versuchsbäume wurde im Radius von 1 m und in einer Tiefe bis zu 1 m zu einem Drittel vorsichtig freigelegt. Dazu wurden Spaten, kleine Schaufeln, Spachtel und kleine Handfeger eingesetzt. Die Wurzeln wurden in Hauptwurzeln und Seitenwurzeln der jeweiligen Ordnung eingeteilt und gekennzeichnet. Die Anordnung der Wurzeln im freigelegten Wurzelsystem wurde fotografisch dokumentiert. Die Kennzeichnung der Bäume erfolgte mit Hilfe der von SCHWÄRZEL (1996) festgelegten Kartierungsnummern 1, 2, 53, 55, 58, 96, 98 und 101. Diese Bezeichnungen werden weiterhin verwendet.

Im Versuchszeitraum von 1996 bis 1998 kamen verschiedene konventionelle und *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration der Unterlagen zur Anwendung.

5 Ergebnisse

5.1 Konventionelle Verfahren zur Regeneration

5.1.1 Wurzelschnittlinge

Regenerationsversuche im Gewächshaus

Die Regenerationsversuche über Wurzelschnittlinge im Gewächshaus waren erfolgreich. Von allen Unterlagen (UL) konnten innerhalb der drei Versuchsjahre Regenerate in unterschiedlicher Anzahl erzeugt werden.

Die Anzahl der schräg gesteckten Wurzelschnittlinge im April und die Anzahl Schnittlinge mit Sproßbildung im Mai und Oktober des jeweiligen Versuchsjahres zeigt Tab. 9. Auf Grund des in unterschiedlichen Mengen zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials wurde eine unterschiedliche Anzahl an Schnittlingen je UL und je Versuchsjahr gesteckt. Von 1996 bis 1998 wurden insgesamt 2038 Wurzelschnittlinge gesteckt, 340 davon bildeten bis zum Juni des jeweiligen Jahres Sprosse. Dies entspricht einer Regenerationsrate (RR) von 16,7 %. Bis zum Ende der Vegetationsperiode überlebten 186 Wurzelschnittlinge mit Sprossen, dies entspricht 9,1 % der Anzahl gesteckter Wurzelschnittlinge. Die Regenerationsraten der gleichen UL unterschieden sich in den Versuchsjahren. Die Wurzelschnittlinge der UL 55 erbrachten in allen Versuchsjahren die höchsten Regenerationsraten. Über die drei Versuchsjahre nahm die Regenerationsrate der UL 53 kontinuierlich ab. Die UL des Baumes 98 regenerierte nur im Jahr 1998 mit einem Prozentsatz von 1,2. Über die Vegetationsperioden nahm die Anzahl der getriebenen Wurzelschnittlinge bei allen UL ab. Die höchste Ausbeute an getriebenen Schnittlingen im Oktober erbrachte die UL 55 in den Jahren 1996 und 1998. Im Versuchsjahr 1997 wurden prozentual die meisten Regenerate der UL 2 erzielt. Die Versuche zur Regeneration der UL 98 führten 1997 und die der UL 53 und 58 im Jahr 1998 zu keinem Ergebnis. Die Regenerationsraten für die UL 53, 58, 96, 98 und 101 waren über alle Versuchsjahre sehr gering.

Bezüglich der Regenerationsraten im Oktober der jeweiligen Versuchsjahre war nur bei UL 1, 2 und 55 ein statistischer Vergleich möglich. Der Chi-Quadrat-Test (χ^2 , Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$) ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich Regenerationsraten bei der UL 1, jedoch signifikante Unterschiede bei den UL 2 ($\chi^2=16,76$; $\chi^2_{(1; 0,05)}=3,84$) und 55 ($\chi^2=22,92$; $\chi^2_{(2; 0,05)}=5,99$). Paarweise Vergleiche der Ergebnisse der einzelnen Versuchsjahre wurden für die UL 55 durchgeführt. Diese ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Jahren 1996 und 1997 ($\chi^2=15,7$; $\chi^2_{(1; 0,05)}=3,84$) sowie 1996 und 1998 ($\chi^2=17,5$; $\chi^2_{(1; 0,05)}=3,84$). Die Ergebnisse der Jahre 1997 und 1998 unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Tab. 9: Anzahl gesteckter und getriebener Wurzelschnittlinge im Gewächshaus (1996 bis 1998) sowie die erzielten Regenerationsraten (RR)

Tab. 9: Number of stucked root cuttings and root cuttings with shootgrowth in the greenhouse (1996 to 1998) and percentage of regeneration (RR)

Unterlage (UL)	Jahr	Wurzelschnittlinge				
		Anzahl April (gesteckt)	Anzahl Juni (getrieben)	RR %	Anzahl Oktober (lebend)	RR %
53	1996	105	15	14,3	4	3,8
55		60	47	78,3	35	58,3
58		100	14	14,0	2	2,0
1	1997	81	34	42,0	13	16,0
2		131	55	42,0	40	30,5
53		122	4	3,3	1	0,8
55		61	28	45,9	14	23,0
58		98	5	5,1	1	1,0
96		110	4	3,6	1	0,9
98		63	0	0		
101		76	1	1,3	1	1,3
1	1998	159	55	34,6	32	20,1
2		116	25	21,6	11	9,5
53		104	0	0		
55		90	33	36,7	22	24,4
58		62	3	4,8	0	0
96		73	12	16,4	6	8,2
98		173	2	1,2	2	1,2
101		254	3	1,2	1	0,4

Eine Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit der Schnittlinge vom Durchmesser wurde für die UL 1, 2 und 55 festgestellt. Für alle anderen UL war eine Auswertung bezüglich dieses Parameters auf Grund der geringen Anzahl an getriebenen Wurzelschnittlingen nicht möglich. Die höchsten Regenerationsraten wurden mit Wurzelschnittlingen des Durchmessers 0,1 - 0,5 cm (Klasse 1) und 0,6 - 1,0 cm (Klasse 2) erzielt. Im Versuchsjahr 1996 wurden keine Unterschiede bezüglich der Regenerationsraten zwischen den gebildeten Klassen im Juni und im Oktober für die UL 55 festgestellt. 1997 wurde die höchste Regenerationsrate im Juni (55,6 %) und Oktober (40,0 %) bei einem Durchmesser von 0,6 - 1,0 cm erzielt. UL 1 und 2 bestätigten dieses Ergebnis. 41,8 % der getriebenen Schnittlinge entstammten bei UL 1 im Juni der Klasse mit diesem Durchmesser, 40,4 % der Schnittlinge UL 2. Im Herbst des Versuchsjahres lagen die Regenerationsraten in dieser Klasse für UL 1 bei 53,8 % und für UL 2 bei 41,2 %. Im Frühjahr des Jahres 1998 wiederholten sich diese Ergebnisse. Die größten prozentualen Ausbeuten erbrachten für UL 1 und 2 die Schnittlinge der Klasse 0,6 - 1,0 cm. Im

Herbst wurde für UL 1 ein Anteil von 43,8 % an getriebenen Schnittlingen mit dem Durchmesser von 0,1 - 0,5 cm erzielt. Die höchste Regenerationsrate ergab die Klasse 2 (0,6 - 1,0 cm; 46,9%). Schnittlinge dieser Klasse der UL 2 regenerierten mit den höchsten Prozentsätzen (45,5 %). Die größte Anzahl an Regeneraten der UL 55 erbrachten 1998 im Juni und im Herbst die Schnittlinge der Klasse 0,1 - 0,5 cm, gefolgt von der nächsthöheren Klasse.

Die Sproßbildung an den Wurzelschnittlingen setzte in allen Versuchsjahren im Gewächshaus zwei Wochen nach dem Stecktermin ein. Über einen Zeitraum von weiteren acht Wochen wurden zusätzliche Sprosse gebildet. Die durchschnittliche Sproßgröße lag bei 4,2 cm (über alle UL und Jahre) mit einer Spannweite von 2 - 9 cm. Der Zuwachs im folgenden Versuchsjahr (1997 und 1998) betrug bis zu 22 cm. Den größten Zuwachs erzielten die Regenerate der UL 55. Ohne Zuwachs blieben die der UL 96 und 101.

Die Anzahl der gebildeten Sprosse je Schnittling zu Beginn und am Ende der Vegetationsperiode zeigt Tab. 10. Die Wurzelschnittlinge bildeten nach dem Abstecken mehr als einen Sproß. Ausnahmen waren die Wurzelschnittlinge der UL 53, 96 und 101 mit nur einem Sproß je Schnittling 1997. Die Regenerationsrate war bei diesen UL sehr gering, was bei der Interpretation dieser Zahlen nicht außer acht gelassen werden darf. Die Anzahl Sprosse je Schnittling variierte zwischen 1,0 und 2,7. Die Wurzelschnittlinge der UL 55 erbrachten mit durchschnittlich 2,7 Sprossen je Schnittling die größte Anzahl an Regeneraten. Im Laufe der Vegetationsperiode nahm die Anzahl Sprosse je Wurzelschnittling bei allen UL ab. Es erfolgte eine Reduktion bis auf einen Sproß je Wurzelschnittling. Die Variationsbreite lag am Ende der Vegetationsperiode zwischen 1,0 und 1,8 Sprossen je Wurzelschnittling.

Im Versuchsjahr 1998 wurden alle Sprosse je Wurzelschnittling, bis auf einen, für Stecklingsversuche, Veredlungen und Etablierungsversuche *in vitro* genutzt. Die Sprosse wurden im Verlauf der Vegetationsperiode entnommen.

Die Sprosse der waagrecht in das Substrat gelegten Wurzelschnittlinge wurden für Stecklings- und *In-vitro*-Versuche verwendet. Die Schnittlinge bildeten durchschnittlich 12 Sprosse.

Tab. 10: Anzahl gebildeter Sprosse der Wurzelschnittlinge im Mai und Oktober (1996, 1997 und 1998, im Gewächshaus)

Tab. 10: Number of shoots grown from the root cuttings in May and October (1996, 1997 and 1998, in the greenhouse)

UL	Jahr	Sprosse			
		Anzahl (Juni)		Anzahl (Oktober)	
		gesamt	je WS*	gesamt	je WS
53	1996	22	1,5	4	1,0
55		129	2,7	57	1,6
58		25	1,8	3	1,5
1	1997	45	1,7	19	1,5
2		85	1,8	40	1,5
53		2	1,0	1	1,0
55		40	2,7	25	1,8
58		4	1,3	1	1,0
96		1	1,0	1	1,0
98		0			
101		1	1,0	1	1,0
1	1998	65	1,2	22	1,0
2		31	1,2	11	1,0
53		0			
55		45	1,4	23	1,0
58		3	1,0	0	
96		13	1,1	6	1,0
98		2	1,0	2	1,0
101		3	1,0	1	1,0

* WS = Wurzelschnittling mit Sproß

Der Ursprungsort der Sprosse an den Wurzelschnittlingen wurde 1997 und 1998 ermittelt (Tab. 11). Die meisten Sprosse wurden im oberen Drittel der Schnittlinge gebildet. Die Minimum- und Maximumwerte zeigen, daß eine Sproßbildung nicht ausschließlich auf diesen Bereich beschränkt war. Die Sprosse wurden fast über die gesamte Länge der Wurzelschnittlinge (15 cm) gebildet. Die am weitesten vom apikalen Ende entfernten Sprosse bildeten die Schnittlinge der UL 55 (11 cm) und 98 (10 cm). Die Anzahl der gebildeten Sprosse war 1997 und 1998 für die UL 53, 58, 96 und 101 sehr gering (siehe Tab. 10). Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten. Der Abstand vom apikalen Ende wird für die Sprosse der UL 53 mit 4,5 cm angegeben. Es wurden 1997 nur zwei Sprosse im Abstand von 2 und 7 cm gebildet. Die Werte der UL 58, 96 und 101 beziehen sich 1997 auf eine geringe Anzahl gebildeter Sprosse. Eine Wiederholung der Untersuchungen 1998 ergab ebenfalls eine geringe Regenerationsrate für diese UL. Eine Aussage bezüglich des Ursprunges der Sprosse aus den Wurzelschnittlingen ist aus diesem Grund nicht möglich.

Tab. 11: Ursprung der Sprosse der Wurzelschnittlinge (1997 und 1998, im Gewächshaus)

Tab. 11: Origin of the shoots of the root cuttings (1997 and 1998, in the greenhouse)

UL	Jahr	durchschnittlicher Abstand vom apikalen Ende in cm	Min (cm)	Max (cm)
1	1997	3,3	0	6
2		1,1	0	5
53		4,5	2	7
55		2,5	0	11
58		3,3	0	6
96		3,0	0	3
98		- ¹	-	-
101		3,0	3	3
<hr/>				
1	1998	1,1	0	5
2		1,1	0	7
53		-		
55		1,6	0	9
58		3,3	0	7
96		0,5	0	5
98		5,0	0	10
101		5,0	5	5

1= - = keine Sproßbildung nach dem Stecken

Nach jeder Vegetationsperiode wurden die Wurzelschnittlinge, die Sprosse gebildet hatten, aus dem Vermehrungsbeet entnommen und getopft. Die Wurzelneubildung an den Schnittlingen und/oder an den Sprossen wurde bonitiert (Tab. 12). Die Ergebnisse unterschieden sich je UL. Zusammengefaßt über alle Versuchsjahre und alle UL bildeten 47,1 % aller Schnittlinge mit Sproßbildung eigene Wurzeln. 26,2 % der gesteckten Wurzelschnittlinge mit Sproß blieben ohne Wurzelneubildung. In 9,6 % der Fälle brachte der gebildete Sproß eigene Wurzeln hervor und war unabhängig vom Wurzelstück. Eine Kombination von Wurzelneubildung an Wurzel und Sproß erfolgte zu 17,1 %.

Die UL 98 (1997) sowie 53 und 58 (1998) wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da am Ende der Vegetationsperiode keine Sproßbildung an den Wurzelschnittlingen erfolgt war.

Die geringen Stückzahlen der einzelnen Klassen der Wurzelbildung lassen eine statistische Auswertung nicht zu. Die Aussagen bezüglich UL 53 und 58 (1996, 1997) sowie 96 und 101 (1997, 1998) und 98 (1998) sind deshalb nicht repräsentativ.

Tab. 12: Wurzelbildung an den Wurzelschnittlingen am Ende der Vegetationsperiode (1996 bis 1998, im Gewächshaus)

Tab. 12: Formation of roots at the root cuttings at the end of the growing period (1996 to 1998, in the greenhouse)

UL	Jahr	oW ¹		WS ² mW ³		Sp ⁴ mW		WS + Sp mW	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
53	1996	2	50	2	50				
55				29	82,9	6	17,1		
58		2	100						
1	1997	4	30,8	7	53,8	1	7,7	1	7,7
2		16	40	15	37,5			9	22,5
53						1	100		
55		3	21,4	3	21,4	6	42,9	2	14,2
58				1	100				
96				1	100				
101				1	100				
1	1998	6	18,8	16	50,0	3	9,4	7	21,9
2		7	58,3	1	8,3			4	33,3
55		3	13,6	10	45,5	1	4,5	8	36,4
96		4	66,7	2	33,3				
98		1	50					1	50,0
101		1	100						
Summe		49	26,2	88	47,1	18	9,6	32	17,1

1 = oW = ohne Wurzeln 2 = WS = Wurzelschnittling 3 = mW = mit Wurzeln 4 = Sp = Sproß

Eine Abhängigkeit der Regeneration vom Ursprung der geernteten Wurzelschnittlinge im Gesamtwurzelsystem konnte nicht festgestellt werden. Eine Auswertung bezüglich dieses Parameters war wegen der geringen Ausbeute an getriebenen Wurzelschnittlingen nicht möglich.

Regenerationsversuche im Freiland unter Folie

Die Sproßbildung an den Wurzelschnittlingen setzte im Freiland unter Folie, ebenso wie die im Gewächshaus, zwei Wochen nach dem Stecken ein. Zusätzliche Sprosse wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen gebildet. Die Sprosse erreichten im Freiland zum Ende der Vegetationsperiode eine Höhe von 2 bis 25 cm. Der Zuwachs im folgenden Jahr lag zwischen 6 und 45 cm. Die größten Höhen und Zuwächse erzielten die Regenerate der UL 53.

Auf Grund der geringen Regenerationsraten mußte, wie auch bei der Gewächshausvariante, auf eine Auswertung der Regenerationsfähigkeit bezüglich der Anordnung der Wurzeln im

Gesamtwurzelsystem verzichtet werden. Ebenso können keine gesicherten Aussagen bezüglich der Regenerationsfähigkeit in Abhängigkeit vom Durchmesser der gesteckten Wurzeln gemacht werden. Zusammengefaßt über die Versuchsjahre und die UL der verschiedenen Bäume erbrachten die Wurzelschnittlinge mit einem Durchmesser kleiner als 1,5 cm mehr Regenerate als die mit größerem Durchmesser. Die Ergebnisse der Regenerationsversuche der UL über Wurzelschnittlinge im Freiland zeigt Tab. 13.

Tab. 13: Anzahl gesteckter und getriebener Wurzelschnittlinge im Freiland unter Folie (1996 bis 1998) sowie die erzielten Regenerationsraten (RR)

Tab. 13: Number of stucked root cuttings and root cuttings with shootgrowth in open ground under a plastic tunnel (1996 to 1998) and percentage of regeneration (RR)

UL	Jahr	Wurzelschnittlinge				
		Anzahl		RR	RR	
		Mai (gesteckt)	Juni (getrieben)	%	Anzahl Oktober (lebend)	%
53	1996	82	4	4,9	2	2,4
55		27	6	22,2	0	0
58		64	2	3,1	0	0
1	1997	62	20	32,3	11	17,7
2		44	8	18,2	6	13,6
58		54	6	11,1	2	3,7
96		25	0	0		
98		28	0	0		
101		25	0	0		
1	1998	133	7	5,3	5	3,8
2		105	12	11,4	9	8,6
53		57	1	1,8	1	1,8
55		69	8	11,6	8	11,6
58		34	0	0		
96		78	3	3,9	3	3,9
98		138	0	0		
101		241	1	0,4	1	0,4

Die Anzahl des zur Verfügung stehenden Materials der einzelnen UL war unterschiedlich. Wurzelschnittlinge der UL 53 und 55 wurden 1997 auf Grund von mangelndem Ausgangsmaterial im Freiland nicht in die Versuche einbezogen. Über die Versuchsjahre wurden insgesamt 1266 Wurzelschnittlinge gesteckt. Im Juni bildeten 78 davon Sprosse. Das entspricht einer Regenerationsrate von 6,2 %. 48 der gesteckten Schnittlinge waren zum Ende der Vegetationsperiode lebensfähig (3,8 %). Dies liegt deutlich unter den Ergebnissen der Gewächshausvariante.

Die Regeneration der UL 55 und 58 (1996) sowie die der UL 96, 98 und 101 (1997) und die von den UL 58 und 98 (1998) war nicht erfolgreich. Über die Vegetationsperiode der einzelnen Versuchsjahre nahm die Anzahl Wurzelschnittlinge mit Triebbildung bei allen UL ab. Eine statistische Auswertung, bezogen auf die Regenerationsraten im Oktober der jeweiligen Versuchsjahre, wurde nicht durchgeführt, da die Ausbeuten zu gering waren.

Die Anzahl der gebildeten Sprosse je Schnittling zu Beginn und am Ende der Vegetationsperiode ist in Tab. 14 dargestellt. Die UL unterscheiden sich bezüglich dieses Parameters.

Tab. 14: Anzahl gebildeter Sprosse der Wurzelschnittlinge im Mai und Oktober (1996, 1997 und 1998, im Freiland unter Folie)

Tab. 14: Number shoots grown from the root cuttings in May and October (1996, 1997 and 1998, in open ground under a plastic tunnel)

UL	Jahr	Sprosse			
		Anzahl (Juni)		Anzahl (Oktober)	
		gesamt	je WS*	gesamt	je WS
53	1996	9	2,3	4	2,0
55		45	7,5	0	0
58		18	9,0	0	0
1	1997	46	2,3	14	1,6
2		28	3,5	9	1,5
58		44	7,3	4	2,0
96		0			
98		0			
101		0			
1	1998	17	2,4	5	1
2		37	3,1	9	1,1
53		1	1	1	1
55		52	6,5	9	1
58		0			
96		6	2,0	4	1,3
98		0			
101		1	1	1	1

* WS = Wurzelschnittling mit Sproß

Die Spannweite lag zwischen einem und neun Sprossen je Schnittling. Im Vergleich zur Gewächshausvariante wurden durchschnittlich mehr Sprosse gebildet. Die UL 96, 98 und 101 (1997) und die UL 58 und 96 (1998) konnten im Freiland nicht über Wurzelschnittlinge regeneriert werden. Die höchste Anzahl an Sprossen bildeten die Schnittlinge der UL 58 (1996), die geringste die der UL 53 (1998) und 101 (1998). Über die Vegetationsperioden nahm die Anzahl der Sprosse ab. Sie wurde im Oktober des jeweiligen Versuchsjahres mit einem bis zwei Sprossen je Wurzelschnittling bonitiert. 1998 wurde ein Teil der gebildeten Sprosse für

Versuche zur Stecklingsvermehrung und zu Veredlungen genutzt. Die Sprosse wurden im Verlauf der Vegetationsperiode geerntet.

Im Juli des jeweiligen Versuchsjahres wurde der Ursprung der gebildeten Sprosse an den Wurzelschnittlingen bonitiert (Tab. 15). Es zeigte sich, daß in den Jahren 1996 und 1997 die meisten Sprosse in der ersten Hälfte der Wurzelschnittlinge gebildet worden waren. Der Abstand vom apikalen Ende der Schnittlinge war bei den Sprossen, die im Freiland gebildet wurden, höher als bei den im Gewächshaus gebildeten. Im Versuchsjahr 1998 beschränkte sich die Sproßbildung wie bei der Gewächshausvariante auf das obere Drittel. Die Minimum- und Maximumwerte zeigen, daß über die gesamte Länge des Wurzelschnittlings (15 cm) Sprosse gebildet wurden. Die ermittelten durchschnittlichen Abstände vom apikalen Ende beziehen sich 1998 bei den UL 58 und 101 auf nur einen gebildeten Sproß und sind nicht repräsentativ.

Tab. 15: Ursprung der Sprosse der Wurzelschnittlinge (1996 bis 1998, im Freiland unter Folie)

Tab. 15: Origin of the shoots of the root cuttings (1997 and 1998, in open ground under a plastic tunnel)

UL	Jahr	durchschnittlicher Abstand vom apikalen Ende in cm	Min (cm)	Max (cm)
53	1996	7,8	0	14
55		7,6	0	12
58		6,4	3	10
1	1997	4,3	0	10
2		3,3	1	9
58		5,4	4	5
1	1998	0,7	0	2
2		1,7	0	6
53		1	1	1
55		0,3	0	2
96		0,25	0	1
101		1	1	1

Zum Ende der Vegetationsperiode wurden die Wurzelschnittlinge mit Sproßbildung dem Grundbeet entnommen und getopft. Die Wurzelneubildung an den Schnittlingen wurde bonitiert (Tab. 16). Zwischen den UL wurden Unterschiede bezüglich dieses Parameters festgestellt. Auf Grund der geringen Stichprobenumfänge je Klasse ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse eingeschränkt. Eine statistische Auswertung erfolgte nicht. Zusammengefaßt über alle Versuchsjahre und UL war die prozentuale Ausbeute an Wurzelschnittlingen, die zusätzlich zum Sproß neue Wurzeln gebildet hatten, genauso groß wie der Anteil der Schnittlinge, die keine neuen Wurzeln gebildet hatten (31,3 %). Bei 25 % der bonitierten Wurzelschnitt-

linge wurde eine Wurzelbildung am Sproß festgestellt. Eine Kombination von Wurzelneubildung am Schnittling und am Sproß erfolgte an 12,4 % der untersuchten Wurzelschnittlinge.

Tab. 16: Wurzelbildung an den Wurzelschnittlingen am Ende der Vegetationsperiode (1996 bis 1998, im Freiland unter Folie)

Tab. 16: Formation of roots at the root cuttings at the end of the growing period (1996 to 1998, in open ground under a plastic tunnel)

UL	Jahr	oW ¹		WS ² mW ³		Sp ⁴ mW		WS + Sp mW	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
53	1996	1	50			1	50		
1	1997	3	27,3	3	27,3	3	27,3	2	18,2
2		3	50	2	33,3	1	16,7		
58		2	100						
1	1998			2	40	3	60		
2		2	22,2	3	33,3	1	11,1	3	33,3
53				1	100				
55		2	25	2	25	3	37,5	1	12,5
96		2	66,7	1	33,3				
101				1	100				
Summe		15	31,3	15	31,3	12	25	6	12,4

1 = oW = ohne Wurzeln 2 = WS = Wurzelschnittling 3 = mW = mit Wurzeln 4 = Sp = Sproß

5.1.2 Veredlungen

Die Anzahl der gelungenen und nicht gelungenen Veredlungen sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt. Die Säulengröße charakterisiert die Anzahl der durchgeführten Veredlungen der jeweiligen Kombination über die Versuchsjahre. Die schwarzen Balken geben die Anzahl der 1998 zur Verfügung stehenden Veredlungen wieder. Die einzelnen Daten der durchgeführten Kombinationen befinden sich im Anhang (A 5).

Die Ausbeute an gelungenen Veredlungen unterschied sich je UL. Durch die Veredlung von Reisern des jeweiligen Baumes auf Wurzelstücke der jeweiligen UL wurde für alle einbezogenen Bäume die am Originalstandort vorhandene Sorten-Unterlagen-Kombination wiederhergestellt. Die größten Ausbeuten erzielten die UL 1, 2 und 55. Hier stehen für weitere Beobachtungen zwischen 7 und 14 Veredlungen zur Verfügung.

Um den Wurzelschnittling zum Austreiben anzuregen, wurden Wurzelstücke auf die UL 'Bittenfelder' veredelt. Diese Kombination führte zum Erfolg, wenn Wurzeln der UL 2, 53 und 55 genutzt wurden, doch die Ausbeuten waren sehr gering. Die größte Anzahl (neun) wurde mit den Wurzeln der UL 55 erzielt.

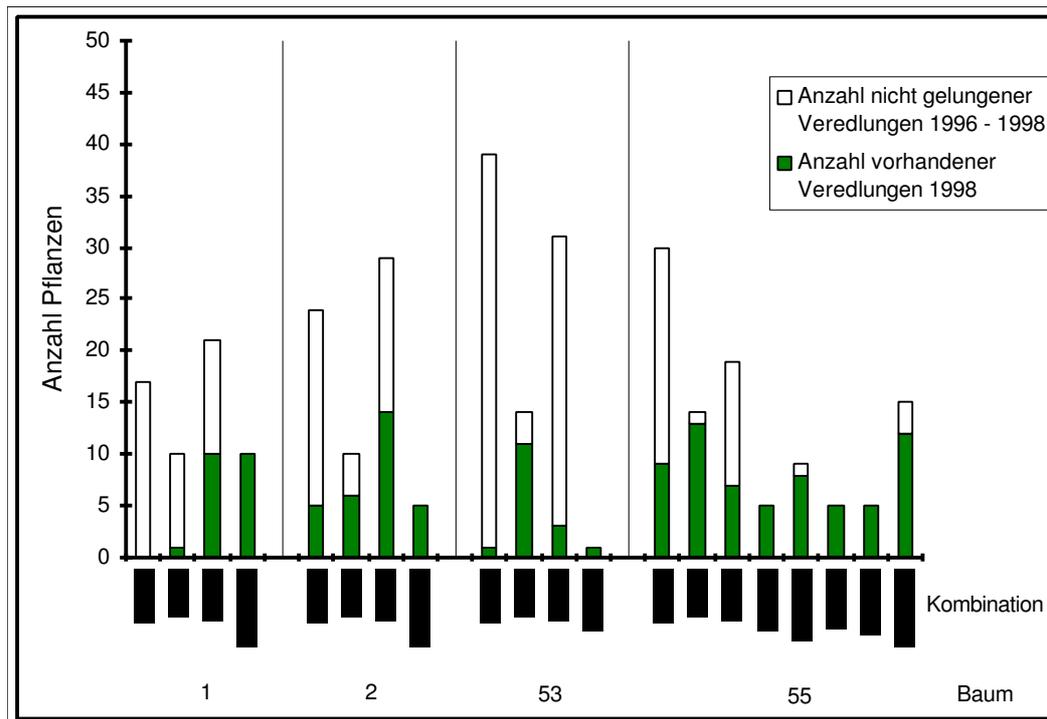


Abb. 1: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen 1, 2, 53 und 55 über Veredlungen, Anzahl vorhandener und nicht gelungener Veredlungen, Zusammenfassung der Jahre 1996 - 1998

Fig. 1: Regeneration results of rootstocks 1, 2, 53 and 55 by graftings, number of available and not succeeded graftings; summary over the years 1996 to 1998

z.B. : BIT / WS = Veredlungskombination : Unterlage/Propfpartner

Bit = Sämling Bittenfelder

WS = Wurzelschnittling

So = Sorte des jeweiligen Baumes

WS96 = Regenerat eines Wurzelschnittlings des Jahres 1996

ST96 = Steckling von 1996

IV97 = *in vitro* vermehrte Pflanze (Akklimation 1997)

M9 = Unterlage M 9

WS98 = Sproß des Wurzelschnittlings von 1998

Durch die Verwendung des Sämlings 'Bittenfelder' als UL und Reiser der Sorte des jeweiligen Versuchsbaumes als Propfpartner, stand die Sorte der einzelnen Bäume auf dem Versuchsgelände zur Verfügung. Mit unterschiedlichen Ausbeuten gelang diese Kombination für alle einbezogenen Versuchsbaume.

Im Versuchsjahr 1998 wurden die Regenerate der Unterlagen verschiedener Vermehrungsherkünfte (Steckling, Wurzelschnittling, *In-vitro*-Pflanze) vorangegangener Jahre als Vered-

lungspartner genutzt. Da der Zuwachs der Regenerate innerhalb einer oder zweier Vegetationsperioden nicht zufriedenstellend war, standen nur eine begrenzte Anzahl Pflanzen mit ausreichendem Wurzelhalsdurchmesser für die Veredlungen zur Verfügung. Die Regenerate der UL 53, 55 und 58 wurden in diese Versuche einbezogen. Die Anwachsergebnisse waren sehr gut; sie lagen zwischen 88,9 und 100 %.

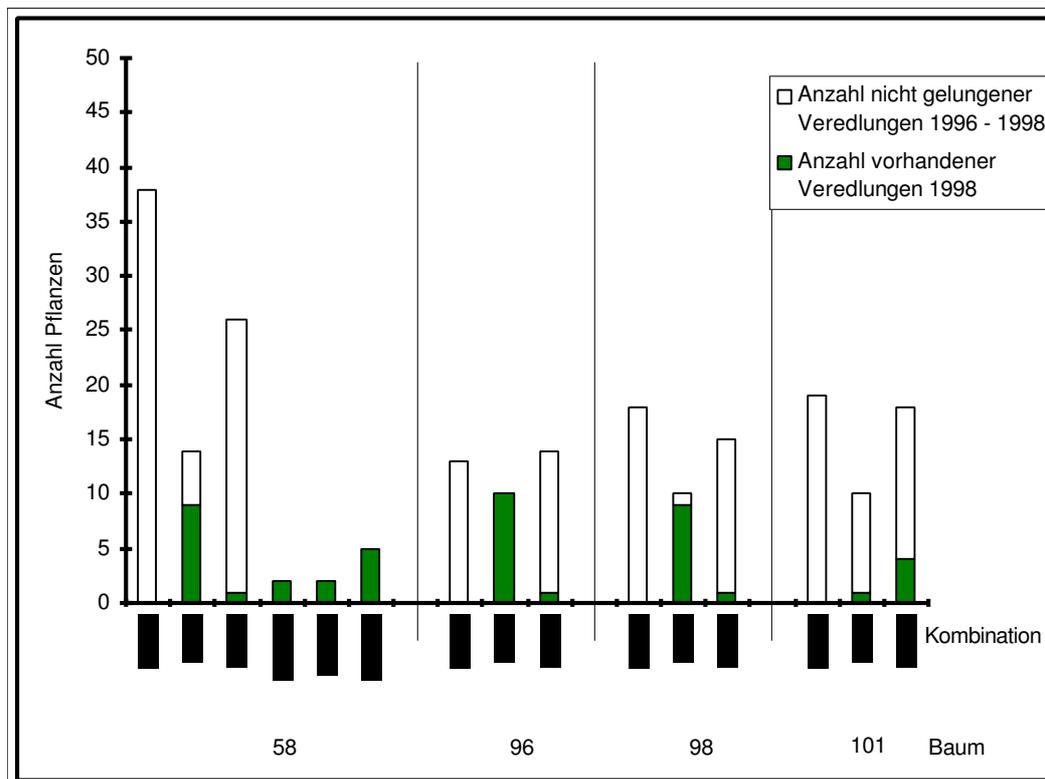


Abb. 2: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen 58, 96, 98 und 101 über Veredlungen, Anzahl vorhandener und nicht gelungener Veredlungen, Zusammenfassung der Jahre 1996 - 1998

Fig. 2: Regeneration results of rootstocks 58, 96, 98 and 101 by graftings, number of available and not succeeded graftings; summary over the years 1996 to 1998

z.B.: BIT / WS = Veredlungskombination : Unterlage/Propfpartner
 Bit = Sämling Bittenfelder
 WS = Wurzelschnittling
 So = Sorte des jeweiligen Baumes
 ST96 = Steckling von 1996
 IV97 = *in vitro* vermehrte Pflanze (Akklimation 1997)
 M9 = Unterlage M 9

Durch die Veredlung von grünen Sprossen der Wurzelschnittlinge des Jahres 1998 auf die Unterlage M9 sollte ein früherer Übergang in die generative Phase erreicht werden. 80 bis 100 % der Veredlungen gelangen mit Sprossen der Wurzelschnittlinge der UL 1, 2 und 55. Sprosse von Schnittlingen der anderen UL standen für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung.

5.1.3 Verletzung der Baumwurzeln

Durch Verletzungen der Baumwurzeln der untersuchten Bäume sollte Wurzel- und Sproßwachstum angeregt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Behandlungen 1996 und 1997 waren nicht zufriedenstellend.

Die Verletzung der Wurzeln der UL 55 führte neben der verstärkten Wurzelneubildung zu einer Sproßbildung (Abb. 3). In den Jahren 1996 und 1997 wurden jeweils drei neue Sprosse gebildet. Sie wurden nicht von der Unterlage getrennt. Es erfolgte eine Beobachtung des Wachstums im Verlauf der Versuchsjahre. Eine Veredlung mit der Sorte des Baumes ist anzustreben. Überschüssige Sprosse könnten Ausgangsmaterial für Vermehrungsversuche unterschiedlicher Art sein.

An den Wurzeln der anderen UL wurde keine Sproßbildung erzielt.

An den Wurzeln aller Versuchsbäume fand nach der Freilegung der Wurzeln in den Versuchsjahren und der Ernte der Wurzelschnittlinge eine verstärkte Wurzelneubildung stand. Dies wurde in den jeweils folgenden Jahren bei der erneuten Freilegung der Wurzelsysteme sichtbar. Diese Wurzelbildung war nicht auf die gezielt verletzte Wurzeln beschränkt. Sie setzte überall dort ein, wo bei der Freilegung der Wurzeln Verletzungen stattgefunden hatten. Ebenso an Schnittstellen, die durch die Ernte der Wurzelschnittlinge entstanden waren.

An den gezielt verletzten Wurzelbereichen wurde Wundkallus gebildet. Dieser war Ausgangsmaterial für die Versuche zur Regeneration über Kalli *in vitro* (Kapitel 5.2.2).



Abb. 3: Sproß- und Wurzelbildung nach Verletzung der Wurzeln der Unterlage 55 (1996)

Fig. 3: Formation of roots and shoots after root injuring of the rootstock 55 (1996)

5.1.4 Stecklinge

Für die Versuche zur Regeneration über Stecklinge stand Material verschiedener Vermehrungsherkünfte zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Tab. 17 dargestellt.

Im Versuchsjahr 1996 bewurzelten die Stecklinge der UL 53, 55 und 58 zu 100 %. Da für die Versuche nur eine begrenzte Anzahl Sprosse der Wurzelschnittlinge zur Verfügung stand, sind die Ergebnisse nicht repräsentativ. Die Überwinterung wurde für alle drei bewurzelten Sprosse der UL 53 erfolgreich durchgeführt. Bei den Stecklingen der UL 55 und 58 kam es zu Ausfällen um 40 %.

Die Bewurzelung der Sprosse der Sorte der Originalbäume gelang nicht. In den Jahren 1997 und 1998 wurden die Sprosse der Wurzelschnittlinge der UL 1, 2 und 55 in die Bewurze-

lungsversuche einbezogen. Von den anderen UL stand nicht genügend Sproßmaterial zur Verfügung. Die Bewurzelungsraten bewegten sich zwischen 10 und 89,9 %. Die Gesamtausbeute nach der Überwinterung lag zwischen 10 und 48,1 %.

Die 1997 von *in vitro* vermehrten Pflanzen (UL 55 und 58) gewonnenen Stecklinge wurden zu 100 % bewurzelt. Die Überwinterungsrate lag bei 8,6 % (UL 55) bzw. 40,0 % (UL 58).

Ein bewurzelter Steckling der UL 53, fünf der UL 55 und zwei der UL 58, aus dem Vermehrungsjahr 1996, wurden 1998 als Veredlungsunterlage genutzt (siehe Kapitel 5.1.2).

Tab. 17: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen über Stecklinge (1996 bis 1998); Bewurzelungsrate (BWR) und Überwinterungsrate (ÜWR)

Tab. 17: Regeneration results by cuttings (1996 to 1998); Rooting percentage and survival percentage after the winter

UL /Sorte	Jahr	Anzahl		BWR (%)	Anzahl nach Überwinterung	ÜWR (%)
		Juni (gesteckt)	September (bewurzelt)			
53	1996 ¹	3	3	100	3	100
55		29	29	100	18	62,1
58		7	7	100	4	57,1
1	1997 ¹	6	2	33,3	2	33,3
2		10	1	10	1	10
55		52	44	84,7	25	48,1
53	1997 ²	30	0	0		
55		30	0	0		
58		30	0	0		
55	1997 ³	35	35	100	3	8,6
58		35	35	100	14	40
1	1998 ¹	9	8	88,9		
2		8	3	37,5		
55		79	71	89,9		

1 = Ausgangsmaterial : Sprosse der Wurzelschnittlinge des jeweiligen Jahres

2 = Ausgangsmaterial : Sprosse der Sorte der Originalbäume

3 = Ausgangsmaterial : Sprosse der *In-vitro*-Pflanzen, akklimatisiert 1997

Die durchschnittliche Sproßgröße der Stecklinge zum Steckzeitpunkt lag bei 4 cm. Während der Bewurzelung erfolgte keine Neutriebbildung. Die bewurzelten Stecklinge trieben nach der erfolgreichen Überwinterung durch. Der Zuwachs lag zwischen 10 und 22 cm.

Auf Grund der geringen Stichprobengröße erfolgte keine statistische Verrechnung.

Die durchschnittliche Sproßgröße der Stecklinge zum Steckzeitpunkt lag bei 4 cm. Während der Bewurzelung erfolgte keine Neutriebbildung. Die bewurzelten Stecklinge trieben nach der erfolgreichen Überwinterung durch. Der Zuwachs lag zwischen 10 und 22 cm.

Auf Grund der geringen Stichprobengröße erfolgte keine statistische Verrechnung.

5.2 *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration

5.2.1 Wurzelstücke

Die Regenerationsversuche über Wurzelstücke war bei keiner der untersuchten Unterlagen erfolgreich. Durch die verschiedenen Behandlungsvarianten wurde Kallus-, aber kein Sproßwachstum induziert.

Die Desinfektion reduzierte die durch Bakterien- und Pilzbefall bedingte Ausfallrate. Die Behandlung mit Quecksilberchlorid für 6 Min. nach einer vorgeschalteten Alkoholbehandlung (30 Sek., 70 %ig) ergab weniger kontaminierte Explantate als die anderen durchgeführten Behandlungen.

Die Überschichtung mit sterilfiltriertem Chinosol (0,05 %ig, 0,1 %ig, 0,2 %ig) erbrachte nicht den gewünschten Erfolg. Eine reduzierte Verbräunung der Explantate und eine Verringerung der Infektionsrate wurde im Vergleich zur Kontrolle nicht festgestellt.

Eine Kultivierung der Explantate für drei Tage auf einem Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure reduzierte die Phenolbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Kallusbildung setzte bei den im Frühjahr geernteten Wurzelstücken im Durchschnitt nach 86,8 Tagen ein, bei den im Herbst geernteten nach 33,6 Tagen. Die Anwendung verschiedener Hormone führte ausschließlich zu Kallus-, nicht aber zu Sproßwachstum. Der prozentuale Anteil an kallusbildenden Explantaten war abhängig von der Cytokininkonzentration. BAP (2,0 mg/l) induzierte mehr Kalluswachstum als TDZ (0,1 und 0,2 mg/l). Mit zunehmender Konzentration von 2,4 D und gleicher Konzentration von TDZ (0,2 mg/l) im Medium steigerte sich die Anzahl der Explantate mit Kalluswachstum (Tab. 18). Die Stärke der Kallusinduktion von 2,4 D (0,2 mg/l) entsprach der des IBS in einer Konzentration von 0,1 mg/l.

Der Zusatz von Agar oder Gelrite als Verfestigungsmittel zu den Etablierungs- und Regenerationsmedien erbrachte ebensowenig Unterschiede wie die Kultivierung im Dunkeln oder unter Lichteinfluß.

Tab. 18: Prozentualer Anteil der Wurzelstücke mit Kallus in Abhängigkeit von der Auxinquelle im Medium nach zwei Subkulturen (1996)

Tab. 18: Percentage of root segments with callus in dependence of the auxin source in the medium after two subcultures (1996)

Cytokinin (mg/l)	Auxin (mg/l)			
	IBS (0,1)	2,4 D (0,1)	2,4 D (0,2)	2,4 D (0,4)
TDZ (0,2)	75,0	42,9	71,4	88,9

5.2.2 Kallusstücke

Die Versuche zur Regeneration der Unterlagen über Kallusstücke führten weder zu Kallus- noch zu Sproßwachstum.

Die Desinfektion für drei Minuten mit Quecksilberchlorid (0,2 %ig) ergab weniger Kontamination mit Pilzen und Bakterien als eine Behandlung für eine Minute. Phenole wurden nur in der ersten Subkultur festgestellt. Der Zusatz von TDZ zum Medium in den Konzentrationen von 0,1 mg/l und 0,2 mg/l führte nicht zu Unterschieden bezüglich der Regenerationsfähigkeit. Ebenso führte die Kultur im Dunkeln oder unter Licht nicht zu den gewünschten Erfolgen. Der größte Teil der Explantate verbräunte nach 4 Subkulturen und war nicht mehr lebensfähig. Dies wurde durch eine Schnittprobe festgestellt.

5.2.3 Sprosse

5.2.3.1 Etablierung

In den Versuchsjahren 1996 bis 1998 wurden die Sprosse der Wurzelschnittlinge der UL 1, 2, 53, 55, 58 und 96 erfolgreich *in vitro* etabliert. Die Sprosse der Sorte sowie die der UL 98 und 101 konnten nicht etabliert werden (Tab. 19).

Der Etablierungserfolg der Sprosse der einzelnen Unterlagen war unterschiedlich (Tab. 20). Die größten prozentualen Ausbeuten erzielten die Sprosse der Unterlage 58, die geringsten die der Unterlage 53. Im Durchschnitt wurden zwischen 25 und 77,8 % der zur Verfügung stehenden Sprosse erfolgreich etabliert.

Die Anzahl der für die Etablierung zur Verfügung stehenden Sprosse war je Unterlage verschieden, da die Wurzelschnittlinge der Unterlagen zu ungleichen Prozentsätzen Triebe gebildet hatten (Kapitel 5.1.2).

Tab. 19: Erfolg der Sproßetablierung *in vitro* (1996, 1997 und 1998)¹

Tab. 19: Success of shoot establishment in vitro (1996 to 1998)

UL ²	Jahr	Etablierung	UL	Jahr	Etablierung	UL	Jahr	Etablierung
53	1996	positiv	1	1997	positiv	96	1998	positiv
55		positiv	2		positiv	98		negativ (Bakterien)
58		positiv	53		negativ- (Bakterien)	101		negativ (Bakterien)
			58		positiv			
			96		negativ (Bakterien)			
			98		negativ (Bakterien)			
			S ³		Etablierung			
			53		negativ (Bakterien)			
			55		negativ (Bakterien)			
			58		negativ (Bakterien)			

1 = Ausgangsmaterial : Sprosse der Wurzelschnittlinge

2 = UL = Unterlage

3 = S = Sorte

Tab. 20: Etablierungserfolg (%) der Sprosse der Unterlagen (UL) (1996 bis 1998)

Tab. 20: Success of shoot establishment(%) of shoots of the root cuttings (1996 to 1998)

UL	Anzahl Sprosse desinfiziert	etabliert	Etablierungs- erfolg (%)
1	14	9	64,3
2	18	9	50,0
53	4	1	25,0
55	26	20	76,9
58	9	7	77,8
96	4	3	75,0

Das Wässern der Sprosse für zwei Stunden und die Kultivierung auf einem modifizierten MS-Medium mit Aktivkohle- und Ascorbinsäurezusatz für drei Tage bei 4 °C führte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, zu einer geringeren Kontamination, Phenolbildung und Verbräunung.

Im Versuchsjahr 1996 wurden die Sprosse der UL 53 und 55 nach der ersten Subkultur ein zweites Mal desinfiziert, da ein starker Bakterienbefall aufgetreten war. Die erste Desinfek-

tion mit Quecksilberchlorid (0,1 %ig) für zwei Minuten war nicht ausreichend. Eine zweite Desinfektion für drei Minuten mit 0,2 %igem Quecksilberchlorid verminderte den Bakterienbefall dagegen zufriedenstellend.

5.2.3.2 Vermehrung

Über fünf Subkulturen wurde die Anzahl an Sprossen der verschiedenen Unterlagen ermittelt (Tab. 21). Die Vermehrung erfolgte auf einem modifizierten MS-Medium (M2, Tab. 6, Standardmedium) mit Zusatz von 1,0 mg/l IBS und 1,0 mg/l BAP. Die Unterlagen unterschieden sich in bezug auf die Sproßanzahl. Die höchste durchschnittliche Anzahl an Sprossen erzielten UL 1 und 2, die geringsten UL 53. Die starken Unterschiede zwischen den Subkulturen sind auf erneuten Bakterienbefall zurückzuführen. Dies war besonders bei Sprossen der UL 53 zu beobachten. In den ersten fünf Subkulturen erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der Sproßanzahl. Über die Versuchsdauer wurde viermal eine zusätzliche Desinfektion mit Quecksilberchlorid (0,2 %ig) für 3 Min. zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Die Sproßanzahl der UL 55 nahm nach der zweiten Subkultur stark ab. Dies war ebenfalls durch einen stetigen Bakterienbefall begründet. Erst ab der fünften Subkultur stieg die Anzahl an Sprossen an.

Tab. 21: Anzahl an Sprossen der Unterlagen (UL) 53, 55, 58 (1996) sowie 1 und 2 (1997) in den ersten fünf Subkulturen

Tab. 21: Number of shoots of the rootstocks 53, 55, 58 (1996) and 1, 2 (1997) after five subcultures

UL	Anzahl an Sprossen nach					Ø Sproßanzahl
	Subkultur 1	Subkultur 2	Subkultur 3	Subkultur 4	Subkultur 5	
53	2,5	1,2	1,7	1,5	0,9	1,56
55	2,2	4	1	1	2	2,04
58	1,3	1,4	1,5	3,1	1,5	1,76
1	2,4	2,5	1,4	2,9	3,3	2,50
2	0,7	3,0	1,8	3,7	2,9	2,42

Zur Optimierung der Vermehrung wurde in den Versuchsjahren 1997 und 1998 ein Versuch auf drei verschiedenen Medien durchgeführt (Kapitel 4.2.3.2). Der Beginn erfolgte jeweils nach der achten Subkultur *in vitro*. In diese Versuche wurden die Sprosse der UL 1, 2, 55 und 58 einbezogen. Von allen anderen stand zu diesem Zeitpunkt nicht genügend Sproßmaterial zur Verfügung. Die Ergebnisse der durchschnittlich erzielten Sproßanzahlen, abhängig vom verwendeten Medium zeigt Tab. 22.

Tab. 22: Durchschnittliche Sproßzahl in Abhängigkeit vom Nährmedium und Empfehlung eines Vermehrungsmediums für die Sprosse der einzelnen Unterlagen (UL) (1997 und 1998)

Tab. 22: Average number of shoots in dependence of the medium and recommendation of a medium for the shoots of the rootstocks (1997 and 1998)

UL	Etablierung	Sproßanzahl ¹ je Medium ²			Empfehlung
		1	2	3	
53	1996	2,9 a ³	3,7 a	3,1 a	M 1 / <u>M 2</u> ⁴ M 3
55		4,4 a	3,7 a	1,7 b	<u>M 1</u> / M 2
58		4,9 a	2,6 b	1,9 b	M 1
1	1997	3,6 a	3,3 a	2,4 a	<u>M 1</u> / M 2 / M 3
2		4,0 a	2,9 a	3,2 a	<u>M 1</u> / M 2 / M 3

1 = Durchschnittswerte von fünf Subkulturen, n = 50 je Subkultur

2 = Medium 1 (M 1) = MS + 1,0 mg/l BAP

Medium 2 (M 2) = MS + 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l IBS

Medium 3 (M 3) = MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA₃ + 0,2 mg/l IBS

3 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

4 = unterstrichenes Medium wird zur Vermehrung empfohlen

Für die Sprosse der UL 55, 58, 1 und 2 wird M1 für die Vermehrung empfohlen. Das Medium M2 erbrachte die größte Anzahl an Sprossen für die UL 53. Liegen keine statistisch abgesicherten Unterschiede zwischen den getesteten Medien vor, so richtet sich die Empfehlung nach der größtmöglich erzielten Anzahl an Sprossen. Die Unterschiede zwischen den Medien eins bis drei konnten für die UL 53, 1 und 2 nicht statistisch abgesichert werden. Die Sprosse der UL 58 erzielten die höchste Anzahl an Sprossen statistisch abgesichert auf dem M1. Die Medien eins und zwei unterschieden sich für die Vermehrung der Sprosse der UL 55 signifikant vom Medium drei.

Die Weiterkultur der Sprosse der UL erfolgte auf den jeweils empfohlenen Medien.

Die durchschnittlichen Sproßlängen unterschieden sich auf den verschiedenen Medien und je UL (Tab. 23). Die Vermehrung auf M3 erbrachte für die UL 53, 55 und 58 statistisch abgesichert die längsten Sprosse. Ein Unterschied für die Sprosse der UL 1 bezüglich der drei Medien konnte statistisch nicht gesichert werden. Die längsten Sprosse wurden auf dem Medium drei gemessen. Die Sprosse der UL 2 erzielten auf dem Medium drei die längsten Sprosse. Die Medien eins und drei unterschieden sich nicht signifikant voneinander, jedoch vom Medium zwei.

Tab. 23: Durchschnittliche Sproßlänge in Abhängigkeit vom Nährmedium für die Sprosse der einzelnen Unterlagen (UL) (1997 und 1998)

Tab. 23: Average shoots length in dependence of the medium for the shoots of the rootstocks (1997 and 1998)

UL	Etablierung	Sproßlänge (mm) ¹ je Medium ²		
		1	2	3
53	1996	8,5 c ³	10,7 b	15,3 a
55		14,6 c	18,0 b	28,5 a
58		11,6 c	10,2 b	20,0 a
1	1997	9,1 a	9,2 a	12,1 a
2		16,4 a	10,0 b	24,4 a

1 = Durchschnittswerte von fünf Subkulturen, n = 50 je Subkultur

2 = Medium 1 (M 1) = MS + 1,0 mg/l BAP

Medium 2 (M 2) = MS + 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l IBS

Medium 3 (M 3) = MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA₃ + 0,2 mg/l IBS

3 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

5.2.3.3 Bewurzelung

Mit Ausnahme der UL 96 gelang die Bewurzelung der Sprosse sämtlicher UL. Von der UL 96 stand bisher noch nicht ausreichend Sproßmaterial zur Verfügung.

Im Versuchsjahr 1997 wurde dem Bewurzelungsmedium Agar oder Gelrite als Verfestigungsmittel zugesetzt (Kapitel 4.2.3.2). Der Bewurzelungserfolg unterschied sich bezüglich des Medienzusatzes und der verwendeten UL. Es wurden die Sprosse der UL 55 und 58 in ausreichender Zahl bewurzelt, so daß ein statistischer Vergleich sinnvoll ist. Von der UL 53 wurden in diesem Jahr drei Sprosse erfolgreich bewurzelt. Diese wurden in die statistische Auswertung nicht mit einbezogen.

Abb. 4 zeigt die Unterschiede zwischen den Sprossen der UL 55 und 58 nach der siebten und achten Subkultur bei gleicher Medienzusammensetzung. Die Sprosse der UL 55 bewurzelten signifikant besser als die der UL 58. Weder bei den Sprossen der UL 55 noch bei denen der UL 58 traten signifikante Unterschiede im Bewurzelungserfolg nach sieben und acht Subkulturen auf.

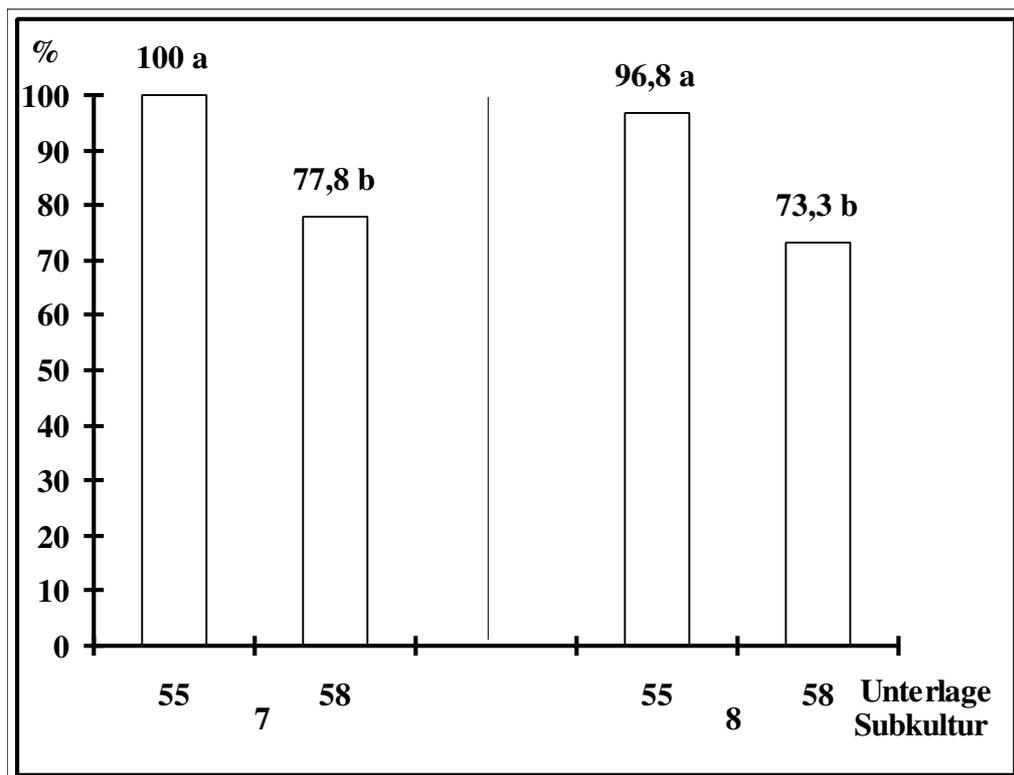


Abb. 4: Bewurzelungserfolg der Sprosse der Unterlagen 55 und 58 (1997); Bewurzelung auf mit Agar verfestigtem Medium (A/A) nach sieben und acht Subkulturen (n=30)

Fig. 4: Rooting success of the shoots of the rootstocks 55 and 58 in vitro (1997); rooting on Agar-medium after seven and eighth subcultures

(unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, $p=0,05$)

Ein Vergleich bezüglich des Verfestigungsmittels im Bewurzelungsmedium - unabhängig von der Subkultur - zeigt Abb. 5. Je UL wurden signifikante Unterschiede bezüglich des Bewurzelungserfolges auf den unterschiedlich verfestigten Medien festgestellt. Die höchsten Bewurzelungsraten erzielten die Sprosse, wenn das Medium (in der hormonhaltigen und der hormonfreien Zusammensetzung) mit Agar verfestigt war (A/A). Mit zunehmendem Anteil von Gelrite nahm die Bewurzelung ab.

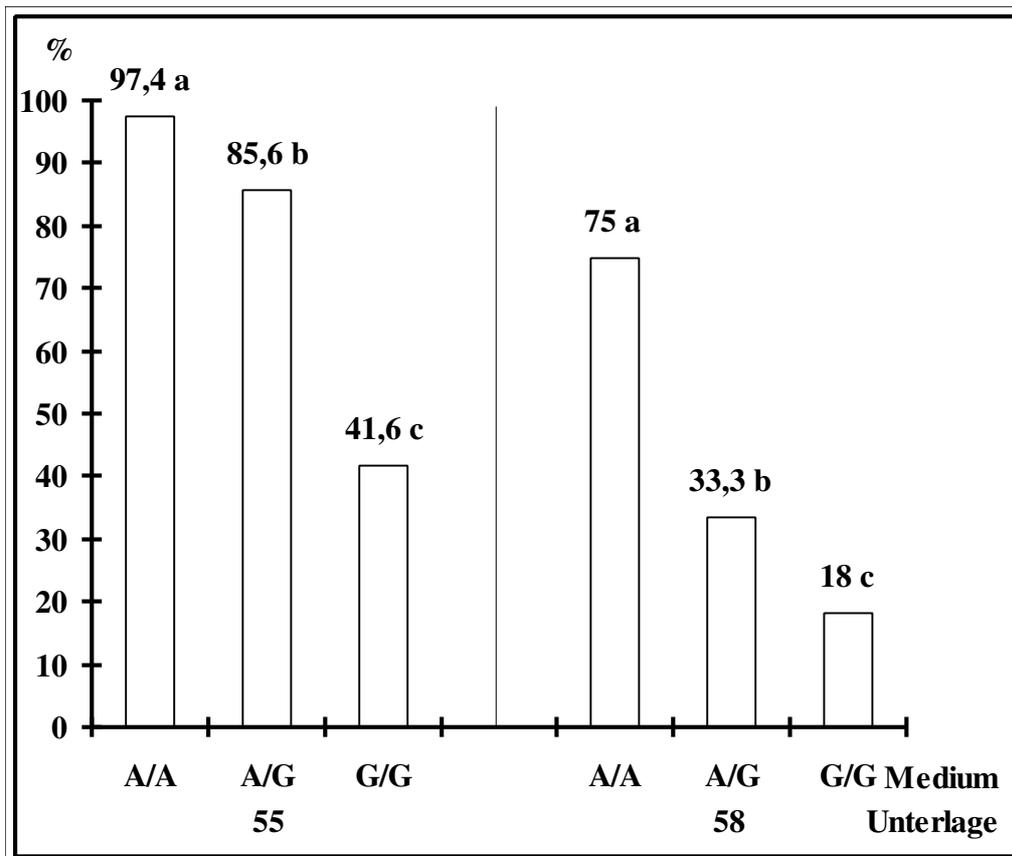


Abb. 5: Bewurzelungserfolg der Sprosse der Unterlagen 55 und 58 *in vitro* (1997); Vergleich der Verfestigungsmittel im Medium (n= 30); (A/A = Agar, A/G = Agar und Gelrite, G/G = Gelrite)

Fig. 5: Rooting success of the shoots of the rootstocks in vitro (1997); comparison of the stabilizer in the medium

(unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05)

Die durchschnittliche Wurzelanzahl je Sproß und die durchschnittliche Wurzellänge unterschieden sich bezüglich der Zusammensetzung des Mediums. Wurde der Anteil von Gelrite im Bewurzelungsmedium erhöht, so nahm die Wurzelanzahl signifikant ab und die Wurzellänge signifikant zu (Tab. 24). Dies galt für die Sprosse der UL 55 und 58. Bei gleicher Medienzusammensetzung bildeten die Sprosse der UL 55 im Vergleich zu den Sprossen der UL 58 signifikant mehr Wurzeln mit einer geringeren Wurzellänge.

Für weitere Bewurzelungsversuche wurde das Medium in beiden Bewurzelungsphasen mit Agar verfestigt.

Tab. 24: Wurzelanzahl und Wurzellänge in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung für die Sprosse der Unterlagen (UL) 55 und 58 (1997)

Tab. 24: Root numbers and root length in dependence of the composition of the medium for the shoots of the rootstocks 55 and 58 (1997)

	UL 55 Medium			UL 58 Medium		
	A / A ¹	G / A ²	G / G ³	A / A	G / A	G / G
Wurzelzahl	7,2 a ⁴	3,4 b	1,0 c	2,8 a	0,8 b	0,3 c
Wurzellänge (mm)	12,8 c	27,3 b	58,1 a	21,0 c	33,5 b	76,5 a

1 = A/A = Bewurzelung auf mit Agar verfestigtem Medium

2 = A/G = Bewurzelung auf mit Agar und Gelrite verfestigtem Medium

3 = G/G = Bewurzelung auf mit Gelrite verfestigtem Medium

4 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

Im Versuchsjahr 1998 wurden die Bewurzelungsversuche für die Sprosse der UL 1, 2, 55 und 58 zu unterschiedlichen Terminen durchgeführt. Dies erfolgte jeweils nach der Kultur auf den für die verschiedenen Unterlagen empfohlenen Vermehrungsmedien (siehe Tab. 22). Zwei Sprosse der Unterlage des Baumes 53 wurden erfolgreich bewurzelt. Diese wurden nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Die Ergebnisse der Bewurzelungsversuche zeigt Tab. 25.

Tab. 25: Bewurzelungserfolg (%) für die Sprosse der Unterlagen (UL) 1, 2, 55 und 58 zu unterschiedlichen Bewurzelungsterminen (1998)

Tab. 25: Rooting success (%) for the shoots of the rootstocks 1, 2, 55 and 58 at different rooting times

UL	Bewurzelungserfolg (%) je Bewurzelungstermin		
	11.05.	29.06.	14.08.
1	89,5 a ¹	87,5 a	90,6 a
2	94,9 a	88,3 a	89,7 a
55	93,9 a	93,1 a	86,7 b
58	83,3 a	71,9 b	62,9 c

1 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

Der Bewurzelungserfolg variierte zwischen 62,9 und 94,9 %. Für die Sprosse der UL 1 und 2 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bewurzelungsterminen festgestellt. Die Sprosse der UL 55 bewurzeln am besten nach dem Bewurzelungsbeginn im Mai und Juni. Diese Termine unterschieden sich signifikant von dem Termin im August. Die Sprosse der UL 58 bewurzeln signifikant schlechter, je später mit der Bewurzelung begonnen wurde. Alle Sprosse hatten von Termin zu Termin jeweils eine weitere Subkultur *in vitro* durchlaufen.

Der χ^2 - Test ($\chi^2_{(1; 0,05)} = 3,84$) ergab keine signifikante Unterschiede zwischen den Sprossen der UL 1, UL 2 und UL 55 an jedem Bewurzelungstermin. Alle diese Unterlagen unterschieden sich jedoch an jedem Termin von der UL 58:

- Termin 11.05.1998 :

Vergleich UL 1 mit UL 58 : $\chi^2 = 3,9$

Vergleich UL 2 mit UL 58 : $\chi^2 = 4,2$

Vergleich UL 55 mit UL 58 : $\chi^2 = 4,1$.

- Termin 29.06.1998 :

Vergleich UL 1 mit UL 58 : $\chi^2 = 4,4$

Vergleich UL 2 mit UL 58 : $\chi^2 = 6,8$

Vergleich UL 55 mit UL 58 : $\chi^2 = 13,5$.

- Termin 14.08.1998 :

Vergleich UL 1 mit UL 58 : $\chi^2 = 20,1$

Vergleich UL 2 mit UL 58 : $\chi^2 = 15,4$

Vergleich UL 55 mit UL 58 : $\chi^2 = 19,8$.

Die Ergebnisse der *In-vivo*-Bewurzelung der Sprosse der UL 1 lagen bei 13,3 %, die der UL 2 bei 60,8 %. Dies lag deutlich unter dem Bewurzelungserfolg *in vitro*. Untersuchungen zur Wurzelanzahl und Wurzellänge wurden nicht durchgeführt.

Die Unterlagen unterschieden sich bezüglich der Anzahl an Wurzeln je Bewurzelungstermin (Tab. 26).

Tab. 26: Wurzelanzahl und Wurzellänge in Abhängigkeit vom Bewurzelungszeitpunkt für die Sprosse der Unterlagen (UL) 1, 2, 55 und 58 (1998)

Tab. 26: Root numbers and root length in dependence of the time of rooting for the shoots of the rootstocks 1, 2, 55 and 58 (1998)

UL	Bewurzelungstermin					
	11.05.		29.06.		14.08.	
	WZ ¹	WL ²	WZ	WL	WZ	WL
1	4,7 a ³	33,2 a	3,4 b	33,7 a	4,5 a	31,8 a
2	8,1 a	33,0 a	5,4 b	33,5 a	6,2 b	35,7 a
55	8,0 a	21,8 b	7,1 a	25,7 a	4,0 b	19,3 b
58	4,7 a	27,3 ab	2,8 b	28,9 a	2,4 b	25,2 b

1 = Wurzelanzahl

2 = Wurzellänge

3 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

Die größte Anzahl Wurzeln wurde an Sprossen der UL 2 bei Bewurzelungsbeginn im Mai gezählt. Lag der Bewurzelungsbeginn im Juni und August, so wurden signifikant weniger Wurzeln gebildet. Sprosse der UL 55 bildeten nach dem Bewurzelungsbeginn im Mai und Juni signifikant mehr Wurzeln als bei Beginn der Bewurzelung im August. Die Unterschiede in der Wurzelanzahl zu den verschiedenen Bewurzelungsterminen waren bei den Sprossen der UL 1 gering. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Terminen im Mai und Juni festgestellt. Je später mit der Bewurzelung begonnen wurde, desto geringer war die durchschnittliche Wurzelanzahl für die Sprosse der UL 58.

Die Sprosse der UL 2 und 55 bildeten signifikant mehr Wurzeln als die Sprosse der anderen UL.

In bezug auf die Wurzellänge wurden für die Unterlagen 55 und 58 signifikante Unterschiede zwischen den Bewurzelungsterminen festgestellt. Innerhalb der einzelnen Termine bildeten die Sprosse der UL 55 und 58 kürzere Wurzeln als die der UL 1 und 2.

5.2.3.4 Akklimation

Die Sprosse der UL unterschieden sich bezüglich des Akklimationserfolges. Im Versuchsjahr 1997 wurde der Erfolg der Akklimation stark von dem in der Bewurzelungsphase genutzten Medium beeinflusst (Tab. 27). Die Tabelle gibt den Akklimationserfolg einerseits bezogen auf die Anzahl bewurzelter Pflanzen (Akklimationserfolg I) und andererseits auf die Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Pflanzen (Akklimationserfolg II) wieder.

Tab. 27: Akklimationserfolg in Abhängigkeit von dem verwendeten Medium für die Sprosse der Unterlagen (UL) 55 und 58 (1997, n = 30)

Tab. 27: Acclimatization success in dependence of the medium used for the shoots of the rootstocks 55 and 58 (1997)

UL	Medium ¹	Akklimationserfolg (%)	
		I (Bezug: Anzahl bewurzelter Sprosse)	II (Bezug: Anzahl aufgesetzter Sprosse)
55	A/A	86,5 a ²	84,2 a
	A/G	88,3 a	75,6 b
	G/G	88,7 a	36,9 c
58	A/A	83,3 a	62,5 a
	A/G	86,7 a	28,9 b
	G/G	50,0 b	8,0 c

1 = Medium = A/A = Bewurzelung auf mit Agar verfestigtem Medium
 A/G = Bewurzelung auf mit Agar und Gelrite verfestigtem Medium
 G/G = Bewurzelung auf mit Gelrite verfestigtem Medium
 2 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

Bezogen auf die Anzahl bewurzelter Sprosse unterschied sich der Akklimatisationserfolg bei der UL 55 bezüglich des verwendeten Verfestigungsmittels nicht signifikant voneinander. Beim Vergleich des Akklimatisationserfolges bezogen auf die Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse trat dieser Einfluß deutlich hervor: Mit zunehmendem Anteil Gelrite im Medium nahm der Erfolg der Akklimatisation signifikant ab. Dies traf ebenfalls für die Sprosse der UL 58 zu. Der Einfluß des Bewurzelungsmediums auf den Akklimatisationserfolg wurde bei dieser Unterlage bereits bei dem Bezug auf die Anzahl bewurzelter Sprosse deutlich. Die prozentuale Ausbeute der akklimatisierten Pflanzen, die auf Medium mit Gelrite in beiden Bewurzelungsphasen bewurzelt wurden, unterschied sich signifikant von den anderen beiden verwendeten Medien.

Der Akklimatisationserfolges der UL 55 und 58 unterschied sich signifikant voneinander, wenn Gelrite dem Bewurzelungsmedium als Verfestigungsmittel zugesetzt wurde und der Bezug die Anzahl bewurzelter Sprosse war ($\chi^2 = 7,6$; $\chi^2_{(1; 0,05)} = 3,84$). Bei Bezug auf die Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse unterschieden sich die UL 55 und 58 bei jeweils gleicher Medienzusammensetzung signifikant voneinander ($\chi^2_{(1; 0,05)} = 3,84$):

- Medium A/A : $\chi^2 = 5,9$
- A/G : $\chi^2 = 35,0$
- G/G : $\chi^2 = 14,9$

Bedingt dadurch, daß die Sprosse nach sieben und acht Subkulturen *in vitro* bewurzelt wurden, erfolgte eine Akklimatisation bei gleicher Medienzusammensetzung (A/A), zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (02.04. und 27.05.1997). Der Akklimatisationserfolg unterschied sich bei den Sprossen beider einbezogener Unterlagen nicht signifikant voneinander. Der spätere Akklimatisationstermin führte dennoch zu geringeren Erfolgen. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob der Bezug auf die Anzahl bewurzelter Sprosse oder auf die Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse vorgenommen wurde.

Im Versuchsjahr 1998 wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten akklimatisiert (18.06., 05.08. und 21.09.). Die Medien enthielten in beiden Bewurzelungsphasen Agar als Verfestigungsmittel. Die Ergebnisse sind in Tab. 28 dargestellt. Es konnten bis zu 100 % der bewurzelter Sprosse erfolgreich akklimatisiert werden. Den höchsten Akklimatisationserfolg erzielten die Sprosse der UL 1 und 55 am zweiten Akklimatisationstermin, den geringsten die Sprosse der UL 1 und 58 zum Termin im Juni. Unterschiede zwischen den Akklimatisationsterminen der Sprosse der UL 2 konnten nicht nachgewiesen werden. Der Akklimatisationserfolg, bezogen auf die Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse, lag deutlich unter dem auf die Anzahl bewurzelter Sprosse bezogenen. Die geringsten prozentualen Ausbeuten erzielten die Sprosse der UL 58.

Tab. 28: Akklimationserfolg in Abhängigkeit vom Akklimationsbeginn für die Sprosse der Unterlagen (UL) 1, 2, 55 und 58 (1998). (Medium A/A, n= 30)

Tab. 28: *Acclimatization success in dependence of the beginning of acclimatization for the shoots of the rootstocks 55 and 58 (1997)*

UL	Akklima- tisations- beginn	Akklimationserfolg (%)	
		I (Bezug: Anzahl bewurzelter Sprosse)	II (Bezug: Anzahl aufgesetzter Sprosse)
1	18.06.	77,5 c ¹	69,4 b
	05.08.	100 a	87,5 a
	21.09.	91,5 b	82,9 a
2	18.06.	86,5 a	81,2 a
	05.08.	97,1 a	85,7 a
	21.09.	97,5 a	82,9 a
55	18.06.	93,5 b	87,9 b
	05.08.	100 a	97,6 a
	21.09.	95,5 b	82,8 b
58	18.06.	56,0 b	46,7 b
	05.08.	96,9 a	69,7 a
	21.09.	89,7 a	56,5 b

1 = unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede, p= 0,05

Der Akklimationserfolg nach der *In-vivo*-Bewurzelung lag unter dem nach der *In-vitro*-Bewurzelung. Es überlebten die Sprosse, die sich *in vivo* bewurzelt hatten.

Nach dem Auspflanzen ins Freiland unter Folie lag der Durchtrieb im Durchschnitt bei 60 cm. Je später mit dem Auspflanzen begonnen wurde, desto geringer war der Zuwachs. Die Internodienlänge war bei den *In-vitro*-Pflanzen gering. Dadurch bedingt wurden viele Seitenzweige gebildet.

5.3.4 Blattsegmente

Die Regeneration der Unterlagen über Blattsegmente führte nicht zu dem gewünschten Erfolg. Es wurde Kalluswachstum induziert, eine Sproßbildung fand jedoch nicht statt. Die Infektionsrate nach der Desinfektion war sehr gering (5,2 %). Nach zwei Wochen auf dem Regenerationsmedium setzte die Kallusbildung verstärkt ein. Die Induktion der Kalli erfolgte überwiegend am Blattrand und an der Oberseite des Blattes (Tab. 29).

Tab. 29: Orte der Kallusinduktion an Blattsegmenten (1996); Anteil der Boniturnoten in Prozent

Tab. 29: Location of the callus induction at leaf segments (1996)

UL	Boniturnote		
	1 ¹	2 ²	3 ³
53	18,8	20,8	60,4
55	0	17,3	82,7
58	7,1	42,9	50,0
Summe	8,3	27,6	64,1

1 = vereinzelte Induktion

2 = Induktion an mehreren Stellen, besonders an Schnittstellen

3 = Induktion am Rand und der Oberseite des Blattes.

Es wurde reinweißer Kallus gebildet, der unter Lichteinfluß ergrünte. Die Größe der Kalli lag zwischen 4 - 10 mm (Tab. 30).

Tab. 30 : Größe der gebildeten Kalli an Blattsegmenten (1996); Anteil der Boniturnoten in Prozent

Tab. 30: Size of the produced callus at leaf segments (1996)

UL	Boniturnote			
	1 ¹	2 ²	3 ³	4 ⁴
53	14,6	18,8	66,6	0
55	0	46,2	53,8	0
58	0	23,2	69,7	7,1
Summe	4,5	29,5	63,5	2,5

1 = winzig (1 mm), 2 = sehr klein (1 - 4 mm),

3 = klein (4 - 10 mm), 4 = mittelgroß (10 - 15 mm)

Tab. 29: Orte der Kallusinduktion an Blattsegmenten (1996); Anteil der Boniturnoten in Prozent

Tab. 29: Location of the callus induction at leaf segments (1996)

UL	Boniturnote		
	1 ¹	2 ²	3 ³
53	18,8	20,8	60,4
55	0	17,3	82,7
58	7,1	42,9	50,0
Summe	8,3	27,6	64,1

1 = vereinzelte Induktion

2 = Induktion an mehreren Stellen, besonders an Schnittstellen

3 = Induktion am Rand und der Oberseite des Blattes.

Es wurde reinweißer Kallus gebildet, der unter Lichteinfluß ergrünte. Die Größe der Kalli lag zwischen 4 - 10 mm (Tab. 30).

Tab. 30 : Größe der gebildeten Kalli an Blattsegmenten (1996); Anteil der Boniturnoten in Prozent

Tab. 30: Size of the produced callus at leaf segments (1996)

UL	Boniturnote			
	1 ¹	2 ²	3 ³	4 ⁴
53	14,6	18,8	66,6	0
55	0	46,2	53,8	0
58	0	23,2	69,7	7,1
Summe	4,5	29,5	63,5	2,5

1 = winzig (1 mm), 2 = sehr klein (1 - 4 mm),

3 = klein (4 - 10 mm), 4 = mittelgroß (10 - 15 mm)

5.3 Bewertung der regenerierten Unterlagen

5.3.1 Morphologische Untersuchungen

Die Sorte der Bäume 1 und 2 wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen. Die molekular-genetischen Untersuchungen (Kapitel 3.4) hatten ergeben, daß die Sorte aller Versuchsbäume, bezogen auf die Auswahl der genannten Primer (Tab. A 4), genetisch identisch war. Zum Vergleich wurden die Boniturdaten der Sorte der Bäume 53, 55 und 58 herangezogen.

5.3.1.1 Blattform

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Boniturklassen bezüglich dieses Merkmals zeigt Abb. 6. Der überwiegende Teil der Blätter der Unterlagen wurde als verkehrt eiförmig klassifiziert. Geringe Anteile fielen der Klasse 'elliptisch' zu, die bei allen Unterlagen vertreten war. Einige Blätter der UL 2 und 55 wurden als eiförmig bonitiert.

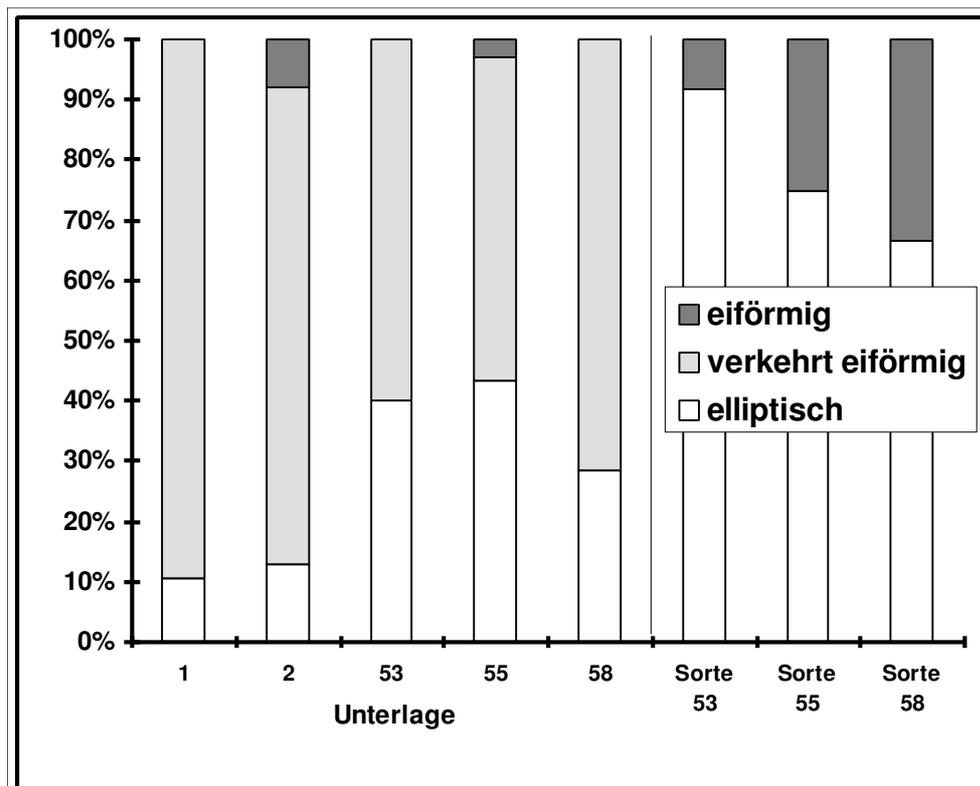


Abb. 6: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58; Boniturmerkmal: Blattform (1997)

Fig. 6: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58; Scoring sigh: leaf shape

Die Blätter der Sorten zeigten überwiegend eine elliptische Blattform. 30 % der Blätter der Sorte 58 wurden als eiförmig eingestuft. Die prozentualen Anteile dieser Blattform war bei den beiden anderen bonitierten Sorten geringer.

5.3.1.2 Blattspitze

Die Blattspitzen der Sorte der Bäume 53 und 58 wurden zu 100 % dem Boniturmerkmal spitz zugeordnet (Abb. 7). 16,7 % der Blätter der Sorte des Baumes 55 wurden als abgerundet bonitiert. Die restlichen Blätter zeigten, wie die der Sorte der anderen Bäume, spitze Blattenden.

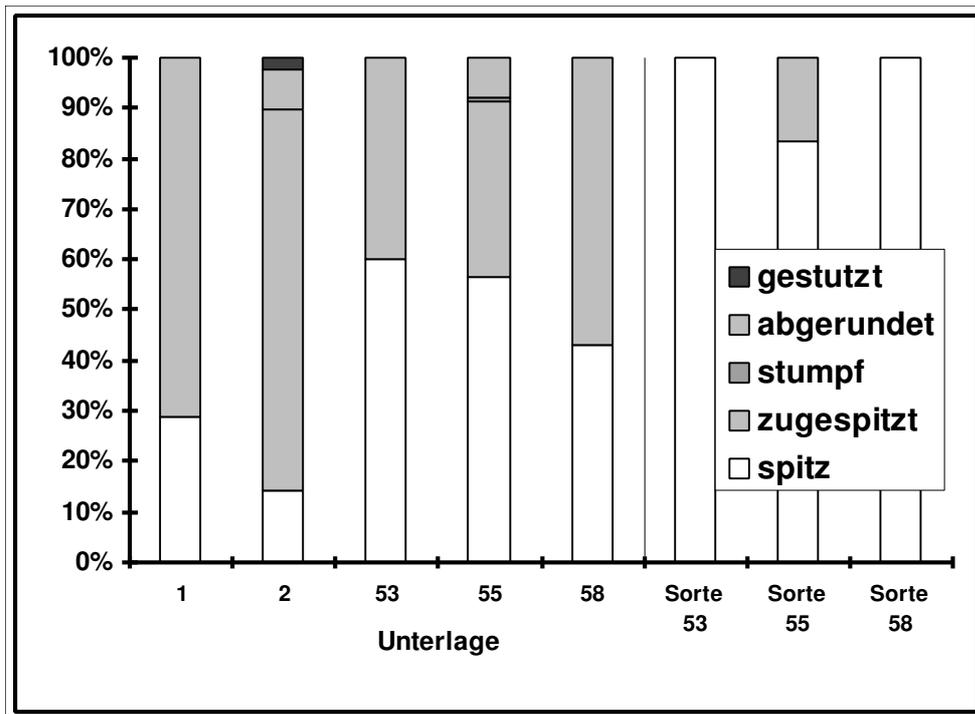


Abb. 7: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58; Boniturmerkmal : Blattspitze (1997)

Fig. 7: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58; Scoring sigh: leaf tip

Die Verteilung der Boniturnoten bezüglich dieses Merkmals war bei den Unterlagen unterschiedlich. Zu verschiedenen Prozentsätzen wurden für die UL 1, 53 und 58 spitze und zugespitzte Blattenden bonitiert. Neben diesem Merkmal traten bei UL 2 abgerundete und gestutzte Blattenden auf. Bei UL 55 wurden zusätzlich stumpfe und abgerundete Blattspitzen bonitiert.

5.3.1.3 Blattrand

Der Rand der Blätter der Sorte war bei allen drei untersuchten Bäumen zu 100 % doppelt gesägt (Abb. 8). Diese Ausprägung des Boniturmerkmals war bei den Blättern der Unterlagen zu hohen Prozentsätzen (über 50 %) vertreten. Daneben wurden Blätter mit gesägtem, gezähntem, welligem und ganzrandigem Blattrand bonitiert. Die prozentuale Verteilung der Boniturnoten war bei allen Unterlagen verschieden.

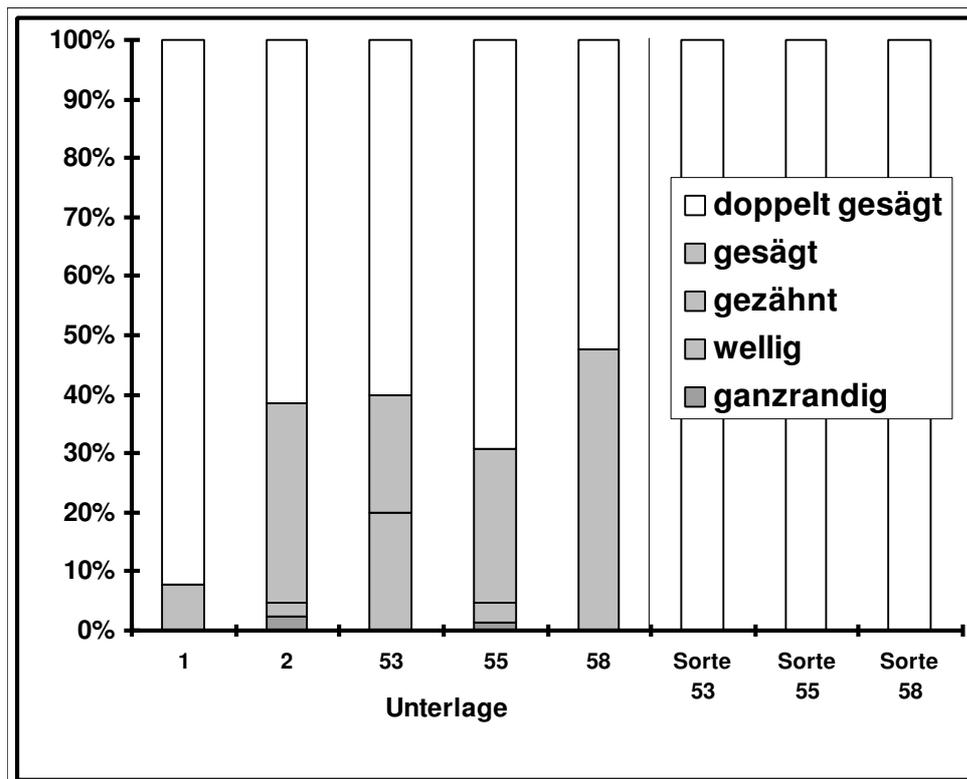


Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58; Boniturmerkmal : Blattrand (1997)

Fig. 8: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58; Scoring sigh: edge of the leaf

5.3.1.4 Drüsen am Blattrand

Die Ergebnisse der Bonitur der Drüsen am Blattrand zeigt Abb. A 7.1. Die Blätter der Sorte der Bäume waren zu über 50 % ohne Drüsenbesatz am Blattrand. An den Blättern der UL 1, 2 und 58 waren zu 100 % Drüsen vorhanden. 40 % der Blätter der UL 53 waren nicht mit Drü-

sen besetzt. Die Blätter der UL 55 zeigten in 3,8 % aller beobachteten Fälle keinen Drüsenbesatz. Die Blätter der Unterlagen zeigten im Vergleich zu denen der Sorte einen stärkeren prozentualen Anteil mit Drüsen am Blattrand.

5.3.1.5 Behaarung

Die Blätter der Sorte zeigten zum Boniturtermin zu 100 % mittlere Behaarung (Abb. A 7.2). Bei den Blättern der UL 1, 2 und 53 wurden neben diesem Merkmal auch Blätter mit dichter, wolliger, krauser Behaarung bonitiert. Zusätzlich zu den genannten Ausprägungen des beobachteten Merkmals traten bei den UL 55 und 58 Blätter mit leichter oder ohne Behaarung auf.

5.3.1.6 Nebenblätter

Der prozentuale Anteil von Blättern, an deren Blattstiel Nebenblätter vorhanden waren, unterschied sich sowohl zwischen den Unterlagen als auch zwischen der Sorte der einzelnen einbezogenen Bäume (Abb. A 7.3).

5.3.2 Molekulargenetische Untersuchungen

5.3.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde 1996 und 1997 im Vergleich zu Markern bestimmter Konzentration ermittelt. Die Bestimmung erfolgte nach Isolierung mit Hilfe der Mini-Prep-Methode. Die Konzentration der einzelnen Unterlagen und der Sorte war unterschiedlich (Tab. 31). Die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde 1997 zusätzlich mit Hilfe des DyNA-Quant-Meßgerätes durchgeführt (Tab. 31). Die Ergebnisse nach der Bestimmung mit Hilfe von Markern wurden in einem Fall durch die Messung mit dem DyNA-Quant-Meßgerät bestätigt. Die DNA-Konzentration aller anderen untersuchten Unterlagen und Sorten wurde mit Hilfe des Meßgerätes höher eingestuft als nach der visuellen Bestimmung anhand der Marker. Die erzielte DNA-Konzentration nach der CTAB-Isolierung lag deutlich über der nach der Isolierung nach der Mini-Prep-Methode. Die DNA der verschiedenen Unterlagen und der einbezogenen Sorten war unterschiedlich stark konzentriert. Die größte Menge an DNA wurde von der Sorte des Baumes 2 gewonnen. Die geringste Menge an DNA lieferten die Blätter der UL 1.

Entsprechend der Konzentration wurde die Verdünnung für die Analyse hergestellt. Pro Ansatz wurden ca. 100 ng DNA benötigt.

Tab. 31: DNA-Konzentration (ng/μl) der in die Versuche einbezogenen Unterlagen¹ und Sorten² (1997); Isolierung der DNA nach der Mini-Prep- und CTAB-Methode; Bestimmung mit Hilfe von Markern und des DyNA-Quant-Meßgerätes

Tab. 31: DNA concentration (ng/μl) of the rootstocks and cultivars (1997)

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)		
	Bestimmung anhand von Markern	Bestimmung mit Hilfe des DyNA-Quant-Meßgerätes	
	Isolierung nach der Mini-Prep-Methode	Isolierung nach der Mini-Prep-Methode	Isolierung nach der CTAB-Methode
UL ¹ 1	2	25	190
UL 2	15	30	255
RgGS ² 1	10	47	290
RgGS 2	10	62	670
RgGS 53	83	83	409

1 = UL = Unterlage.

2 = RgGS = 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'

Nach der Isolierung der DNA wurde 1998 eine Quantifizierung der Konzentration mit Hilfe des Tropfentestes durchgeführt. Die Auswertung der Testergebnisse ergab die in Tab. 32 dar gestellten Konzentrationen für die einzelnen Unterlagen und Sorten. Die Konzentration der DNA der einzelnen Unterlagen und Sorten war verschieden. Die höchste Konzentration erbrachte die UL 2, die geringste die UL 98. Die Spannweite lag zwischen 96 und 1014 ng DNA/μl Lösung.

Bei den Analyseschritten zur Isolierung der DNA führte der Zusatz von Mercaptoethanol zu einer geringeren Verbräunung der Blattproben. Im weiteren wurden nur die Proben mit dem Zusatz dieses Stoffes für weitere Untersuchungen verwendet.

Die Gelauswertung, die neben dem Tropfentest durchgeführt wurde, diente als Maßstab der Verschmutzung der DNA mit RNA. Es waren geringe Verschmutzungen durch RNA vorhanden, so daß eine zusätzliche Reinigung der DNA nicht notwendig war.

Tab. 32: DNA-Konzentration (ng/μl) der in die Versuche einbezogenen Unterlagen¹ und Sorten² (1998); Isolierung der DNA nach der CTAB-Methode

Tab. 32: DNA concentration (ng/μl) of the rootstocks and cultivars (1998)

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)
UL ¹ 1	510
UL 2	1 014
UL 53	391
UL 55	161
UL 58	401
UL 96	247
UL 98	96
UL 101	196
RgGS ² 1	210
RgGS 2	435
RgGS 53	549
RgGS 55	374
RgGS 58	226
RgGS 96	344
RgGS 98	126
RgGS 101	200

1 = UL = Unterlage.

2 = RgGS = 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'

Durch Verdünnung mit sterilem bidestilliertem Wasser wurden 50 μl einer Arbeitslösung hergestellt, 1 μl dieser Lösung sollte 10 ng DNA enthalten. Diese Menge reichte für 20 Analysen bei einer Entnahme von 2,5 μl pro Analyse.

5.3.2.2 Gelelektrophorese 1996

Im Versuchsjahr 1996 wurden die Regenerate der UL 53, 55 und 58 sowie die dazugehörigen Sorten in die Untersuchungen einbezogen. Insgesamt wurden 17 Primer getestet, 11 davon ergaben 35 charakteristische Banden, die zur Auswertung herangezogen wurden. Die einzelnen Unterlagen und Sorten wurden je Primer miteinander verglichen, Gleichheit oder Ungleichheit wurde festgestellt und zusammenfassend in Tab. 33 dargestellt. Die Unterlagen der verschiedenen Bäume unterscheiden sich voneinander und von der jeweiligen Sorte. Unterlage und Sorte sind getrennte Individuen. Somit handelt es sich bei den Versuchsbäumen um Veredlungen. Eine Freimachung der Unterlage von der Sorte hat nicht stattgefunden. Die geringe Anzahl gleicher Banden beim Vergleich der Unterlagen ist zu vernachlässigen. Die Verschiedenheit der Banden überwiegt und ist das entscheidende Maß für die Auswertung. Die Sorte der drei Versuchsbäume ist gleich. Bei allen Bäumen handelt es sich um die 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'.

Tab. 33: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen (1996); Vergleich der Unterlagen und Sorten; (Mini-Prep-Isolierung)

Tab. 33: Results of the moleculargenetically experiments (1996)

	UL ¹ 53	UL 55	UL 58	RgGS ² 53	RgGS 55	RgGS 58
UL 53		2:8 ³	1:10	1:5	2:9	3:8
UL 55	2:8		1:9	1:5	2:8	3:7
UL 58	1:10	1:9		1:5	1:10	0:11
RgGS 53	1:5	1:5	1:5		6:0	6:0
RgGS 55	2:9	2:8	1:10	6:0		11:0
RgGS 58	3:8	3:7	0:11	6:0	11:0	

1 = UL = Unterlage, 2 = RgGS = 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'

3 = Anzahl Primer, die Gleichheit zeigen : Anzahl Primer, die Ungleichheit zeigen

Zahlen = Baumnummern

5.3.2.3 Gelelektrophorese 1997

Die Regenerate der UL 1 und 2 sowie die dazugehörigen Sorten wurden im Versuchsjahr 1997 in die molekulargenetischen Untersuchungen einbezogen. Als Vergleich für die Sorte wurde die Sorte des Baumes 53 in die Analyse eingebracht. 15 von 17 getesteten Primern ergaben 44 auswertbare Banden. Die zusammengefaßten Ergebnisse sind in Tab. 34 dargestellt.

Die DNA der untersuchten Sorte der verschiedenen Bäume unterscheidet sich nicht voneinander. Bei der Sorte der 1997 zusätzlich einbezogenen Bäume handelt es sich ebenfalls um die 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'. Die UL 1 und 2 sind genetisch nicht identisch. Die Sorte steht nicht auf eigener Wurzel. Sorte und Unterlage der jeweiligen Bäume unterscheiden sich voneinander.

Tab. 34: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen (1997); Vergleich der Unterlagen und Sorten; (CTAB-Isolierung)

Tab. 34: Results of the moleculargenetically experiments (1997)

	UL ¹ 1	UL 2	RgGS ² 1	RgGS 2	RgGS 53
UL 1		3 : 12 ³	0 : 15	0 : 15	0 : 15
UL 2	3 : 12		1 : 14	1 : 14	1 : 14
RgGS 1	0 : 15	1 : 14		15 : 0	15 : 0
RgGS 2	0 : 15	1 : 14	15 : 0		15 : 0
RgGS 53	0 : 15	1 : 14	15 : 0	15 : 0	

1 = UL = Unterlage, 2 = RgGS = 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'

3 = Anzahl Primer, die Gleichheit zeigen : Anzahl Primer, die Ungleichheit zeigen, Zahlen = Baumnummern.

5.3.2.4 Gelelektrophorese 1998

1998 standen von allen in die Versuche einbezogenen Unterlagen sowie von allen Sorten der jeweiligen Bäume Regenerate für die DNA-Analyse zur Verfügung. Zusätzlich wurde die DNA von drei verschiedenen *Malus sylvestris*-Herkünften untersucht. Dies sollte eine Zuordnung zu dem Wildtyp ermöglichen. Von insgesamt 10 Primern ergaben 9 auswertbare Bandenmuster. Das Ergebnis der Gelelektrophorese mit dem Primer 29507 zeigt Abb. 9.

Es gibt keinen Unterschied zwischen den Sorten der einzelnen Bäume, denn die Bandenmuster sind identisch. Die Unterlagen aller einbezogenen Bäume unterscheiden sich voneinander und von der jeweiligen Sorte. Die drei *M. sylvestris*-Herkünfte sind untereinander verschieden und sie gleichen nicht den Unterlagen.

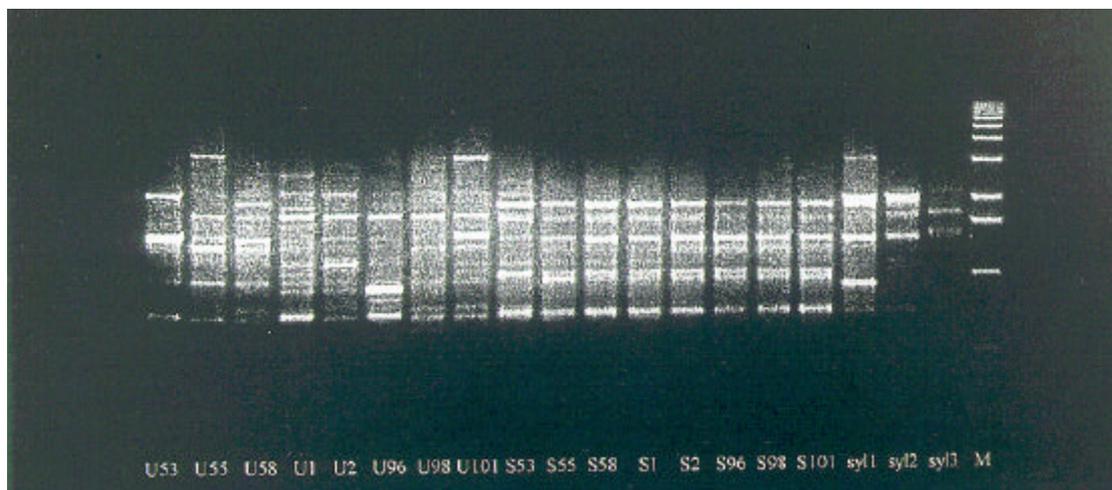


Abb. 9: DNA-Fingerprint nach der RAPD-Amplifizierung für die Unterlagen und Sorte der Versuchsbäume sowie der drei einbezogenen *M. sylvestris*-Herkünfte; Primer 29507 (1998)

Fig. 9: DNA fingerprint after RAPD amplification for the rootstocks and the cultivars of the experimental trees and the three M. sylvestris origins (1998)

M = Marker (1Kb-ladder), U = Unterlage, S = Sorte, Zahlen = Baumnummern,
syl 1 = *M. sylvestris* (Herkunft 3,07 Eicheborn),
syl 2 = *M. sylvestris* (Herkunft 3,10 Buttstätt),
syl 3 = *M. sylvestris* (Herkunft OW 5 Oberwartha 5)

Bei der Analyse der Bandenmuster der einbezogenen Primer wurden 18 Marker (charakteristische Banden) gefunden. Mit Hilfe dieser Marker wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Diese statistischen Methode ermöglicht es, in Form eines Dendrogrammes Gleichheit oder Ungleichheit der einbezogenen Sorten und Unterlagen statistisch abgesichert festzustellen (Abb. 10).

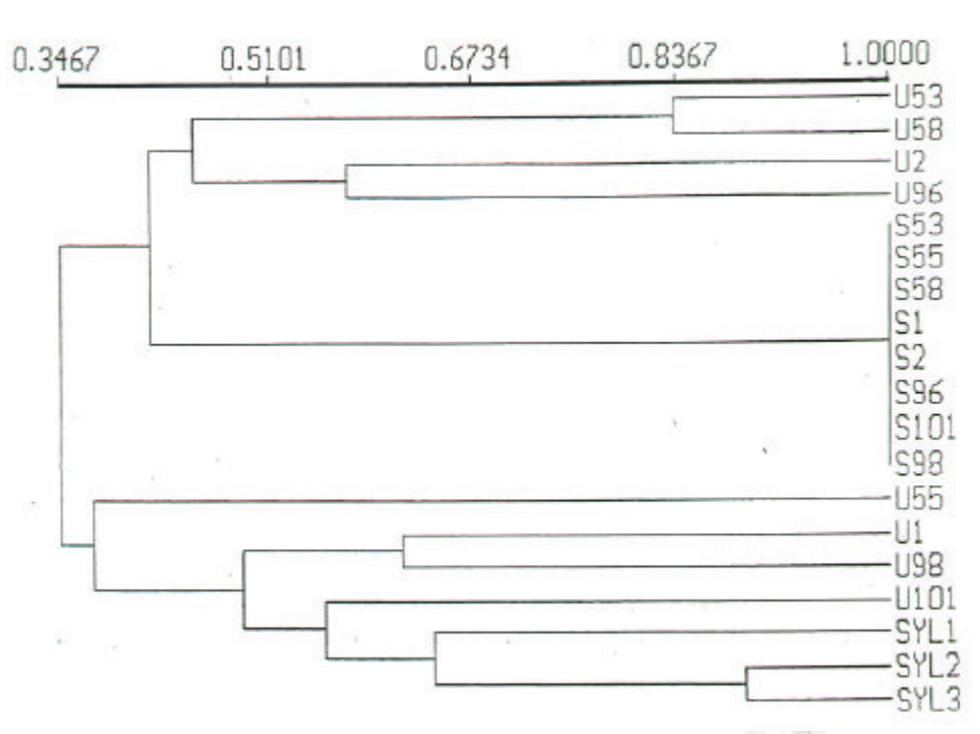


Abb. 10: Dendrogramm der Unterlagen, Sorten und *M. sylvestris*-Herkünfte. Nach der Cluster-analyse auf Basis des Jaccard Koeffizienten, mit Hilfe des Programm-paketes NTSYS-pc (Version 1.70, ROHLF 1993) (1998)

Fig. 10: Dendrogram of the rootstocks, the cultivars and *M. sylvestris* origins (1998)

U = Unterlage, S = Sorte, Zahlen = Baumnummern,
 syl 1 = *M. sylvestris* (Herkunft 3,07 Eicheborn),
 syl 2 = *M. sylvestris* (Herkunft 3,10 Buttstätt),
 syl 3 = *M. sylvestris* (Herkunft OW 5 Oberwartha 5)

Mit Hilfe der Clusteranalyse werden die Fälle einer Stichprobe in mehrere Gruppen (Cluster) zusammengefaßt. Ein Cluster sollte in sich möglichst homogen sein, die Cluster untereinander aber deutlich verschieden. Die Gruppen werden auf Grund von festgelegten Abstandsmaßen gebildet. In einer Gruppe werden die Individuen zusammengefaßt, die einander ähneln. Die Gruppenbildung kann von rechts nach links verfolgt werden. Das Maß der Ähnlichkeit ist auf der oberen Skala abzulesen. Eins bedeutet völlige Identität der Individuen. Je näher das Maß an null geht, desto unähnlicher sind die Individuen, die zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden. Das Dendrogramm zeigt, daß alle Sorten der Bäume gleich sind. Sie wurden zu einer Gruppe, beim Abstandsmaß eins, zusammengefaßt. Die Unterlagen und die *M. sylvestris*-Herkünfte sind voneinander und von der Sorte verschieden. Die Zusammenfassung zu Gruppen erfolgte nach großen Abständen. Es wurden zwei Gruppen von Unterlagen gebildet. Zu der einen Gruppe gehörten die UL 53, 58, 2 und 96. Alle weiteren Unterlagen und die *M. sylvestris*-Herkünfte wurden zu einer zweiten Gruppe zusammengeschlossen.

Mit Hilfe des Jaccard-Koeffizienten ist es möglich, die genetische Gleichheit der einzelnen Unterlagen zueinander sowie zu den Sorten und der Sorten zueinander sowie zu den Unterlagen anzugeben. Die Auswahl der Vergleiche orientiert sich an der zuvor erfolgten Clusterbildung (Abb. 10), die Ergebnisse sind in Tab. 35 dargestellt. Beim Vergleich der Unterlagen zeigen die U 53 und die U 58 mit 83,3 % die größte genetische Gleichheit, die kleinste zeigt der Vergleich der U 55 mit der U 1. Die miteinander verglichenen Sorten stimmen zu 100 % überein.

Tab. 35: Genetische Gleichheit zwischen Sorten und Unterlagen sowie der drei *M. sylvestris*-Herkünfte, 1998; Basierend auf dem Jaccard-Koeffizienten, mit Hilfe des Programmpaketes NTSYS-pc (Version 1.70, ROHLF 1993)

*Tab. 35: Genetically identity between cultivars, rootstocks and the three *M. sylvestris* origins 1998; Based on the Jaccard-coefficient*

Vergleich		Jaccard-Koeffizient	Genetische Gleichheit (%)
U 53	U 58	0,8333333	83,3
U 58	U 2	0,4493493	44,9
U 2	U 96	0,5714286	57,1
U 96	S 53	0,4148495	41,5
S 53	S 55	1,0000000	100
S 55	S 58	1,0000000	100
S 58	S 1	1,0000000	100
S 1	S 2	1,0000000	100
S 2	S 96	1,0000000	100
S 96	S 101	1,0000000	100
S 101	S 98	1,0000000	100
S 98	U 55	0,3467337	34,7
U 55	U 1	0,3711539	37,1
U 1	U 98	0,6153846	61,5
U 98	U 101	0,4871176	48,7
U 101	syl 1	0,5536130	55,4
syl 1	syl 2	0,6410257	64,1
syl 2	syl 3	0,8888889	88,9

U = Unterlage, S = Sorte, Zahlen = Baumnummern

syl 1 = *M. sylvestris* (Herkunft 3,07 Eicheborn)

syl 2 = *M. sylvestris* (Herkunft 3,10 Buttstätt)

syl 3 = *M. sylvestris* (Herkunft OW 5 Oberwartha 5)

5.3.3 Virustestung

Die Ergebnisse des durchgeführten ELISA-Testes zeigt Tab. 35. In den Trieben der UL 53 wurde das Chlorotische Apfelblatfflecken-Virus (CLSV) nachgewiesen. Alle anderen untersuchten Unterlagen waren zum Untersuchungszeitpunkt ohne Virusinfektion.

Tab. 36: Ergebnisse der Virusuntersuchung (1998); (ELISA-Test)

Tab. 36: Results of the virus tests (1998)

Unterlage	Material	ApMV ¹	CLSV ²	SGV ³
1	Blatt	- ⁴	-	-
	Trieb	-	-	-
2	Blatt	-	-	-
	Trieb	-	-	-
53	Blatt	-	-	-
	Trieb	-	+ ⁵	-
55	Blatt	-	-	-
	Trieb	-	-	-
58	Blatt	-	-	-
	Trieb	-	-	-

1 = ApMV = Apple Mosaic Virus (Apfelmosaikvirus)

2 = CLSV = Chlorotic Leam Spot Virus (Chlorotischer Apfelblatfflecken-Virus)

3 = SGV = Stem Grooving Virus (Apfelstammfrucht-Virus)

4 = - = keine Virusinfektion zum Untersuchungszeitpunkt

5 = + = Virusinfektion zum Untersuchungszeitpunkt

5.4 Pflanzenbestand 1998

Die aktuellen Pflanzenbestände 1998 der Regenerationsversuche von 1996 bis 1998 geben die Abbildungen 11 und 12 sowie die Tab. 37 wieder. Die größte Anzahl regenerierter Pflanzen wurde für die UL 55 erzielt. Insgesamt stehen 836 Regenerate (Stecklinge, Wurzelschnittlinge und *In-vitro*-Pflanzen) und 65 Veredlungen unterschiedlicher Kombinationen für weitere Beobachtungen zur Verfügung. Der größte Anteil Regenerate entstammt der *In-vitro*-Vermehrung. Dies gilt ebenso für die Anzahl regenerierter Pflanzen der UL 1 und 2. Hier wurden innerhalb der Versuchsdauer 326 Pflanzen der UL 1 und 365 der UL 2 regeneriert. Von der UL 1 stehen 14 und von UL 2 30 Veredlungen unterschiedlicher Kombinationen zur weiteren Beobachtung zur Verfügung. Von der UL 53 wurden insgesamt 39 Pflanzen über Wurzelschnittlinge, Stecklinge und *in vitro* regeneriert. 30 davon stammen aus der *In-vitro*-Vermehrung. 16 Veredlungen unterschiedlicher Kombinationen waren 1998 vorhanden. Die UL 96, 98 und 101 wurden zu geringen Anteilen regeneriert. Ebenso steht hier eine geringe Anzahl von Veredlungen zur Verfügung.

Tab. 37 : Pflanzenbestand 1998. Regeneration der Unterlagen (UL) 1, 2, 53, 55, 58, 96, 98 und 101 über Veredlungen (1996 bis 1998).

Stock of plants 1998. Regeneration of the rootstocks 1, 2, 53, 55, 58, 96, 98 and 101 by graftings (1996 to 1998).

UL	Veredlungskombination		Anzahl Oktober 1998
	Unterlage	Propfpartner	
1	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	1
	Wurzelschnittling	‘Golden Delicious’	3
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)	10
2	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	6
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	5
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	14
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)	5
53	Bittenfelder	Wurzelschnittling	1
	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	11
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	3
	Steckling (1996)	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	1
55	Bittenfelder	Wurzelschnittling	9
	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	13
	Wurzelschnittling	‘Golden Delicious’	1
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	7
	Steckling (1996)	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	5
	Wurzelschnittling (1996)	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	8
	In-vitro-Pflanze (Akk 1997)	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	5
	M 9	In-vitro-Pflanze (Akk ¹ 1997)	5
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)	12
58	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	9
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	1
	Steckling (1996)	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	2
	In-vitro-Pflanze (Akk 1997)	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	2
	M 9	In-vitro-Pflanze (Akk 1997)	5
96	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	1
98	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	9
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	1
101	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	1
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	4

¹ Akk = Akklimatisationszeitraum

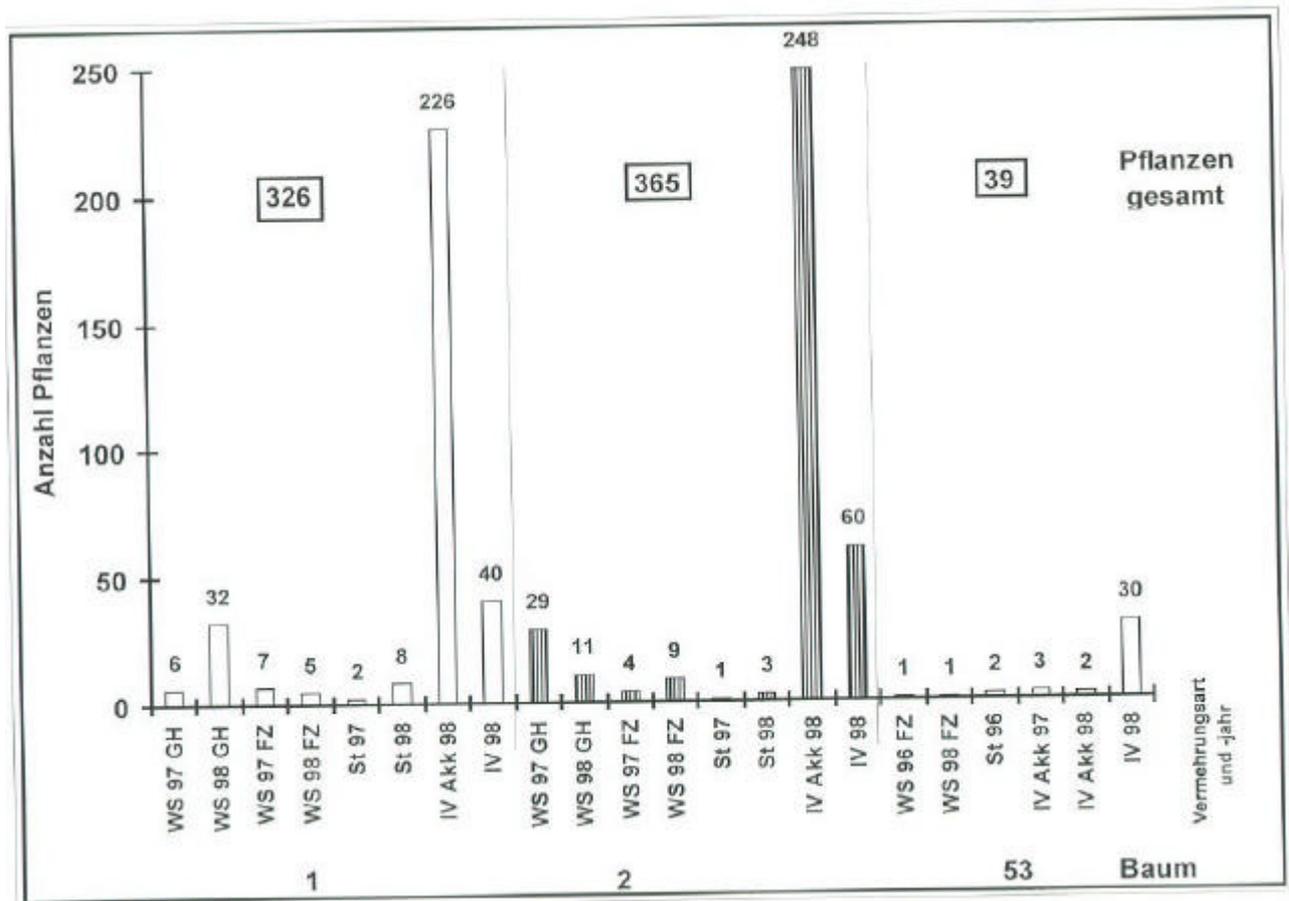


Abb. 11 : Pflanzenbestand 1998, gesamt und je Vermehrungsart für die Unterlagen der Bäume 1, 2 und 53. Wurzelschnittlinge, Stecklinge und *In-vitro*-Pflanzen.

Stock of plants for the rootstocks 1, 2, and 53 (1998).

GH = Gewächshaus, FZ = Freiland im Folienzelt, ST = Steckling, WS = Wurzelschnittling, 96, 97, 98= 1996, 1997, 1998; IV = Pflanzen 1998 in der *In-vitro*-Vermehrung befindlich, IV Akk = akklimatisierte Pflanzen aus der *In-vitro*-Vermehrung.

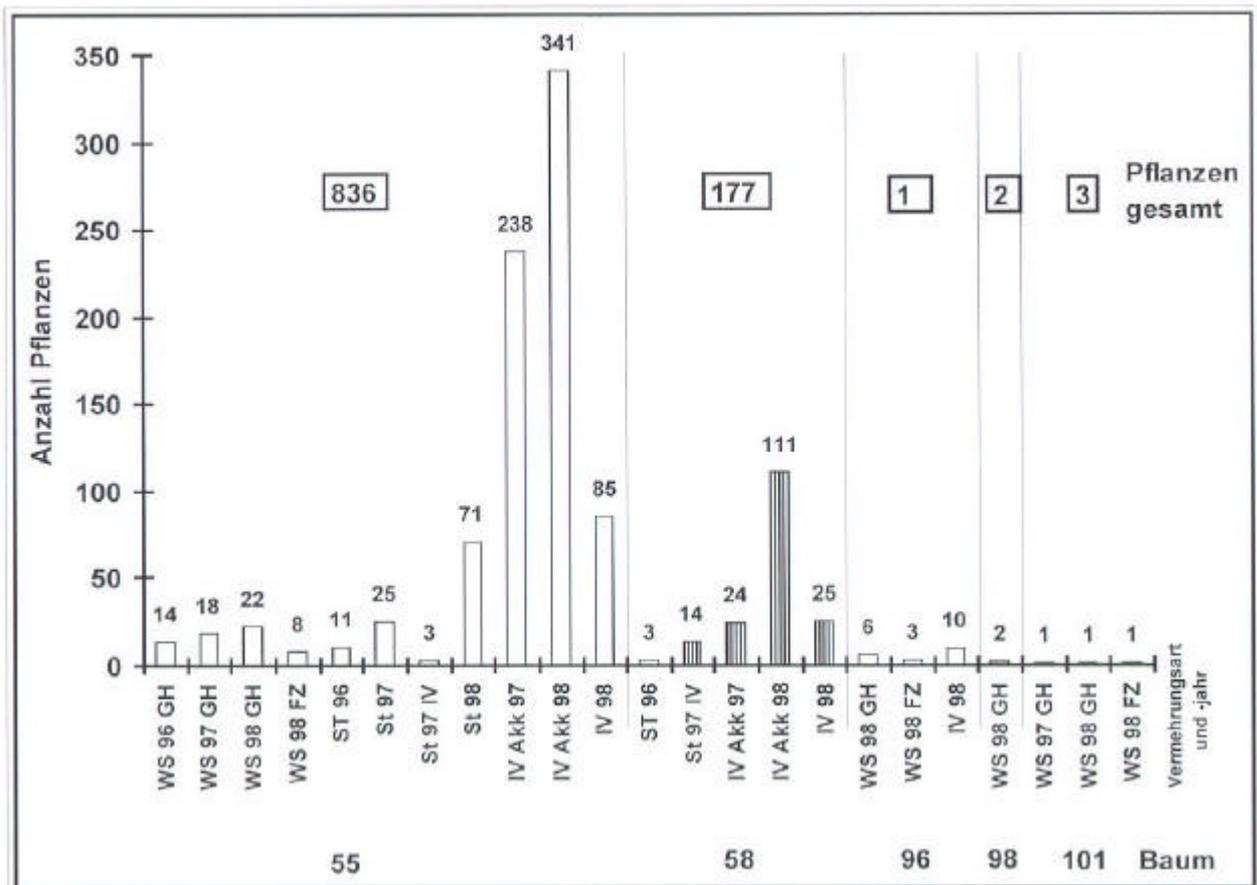


Abb. 12 : Pflanzenbestand 1998, gesamt und je Vermehrungsart für die Unterlagen der Bäume 55, 58, 96, 98 und 101. Wurzelschnittlinge, Stecklinge und *In-vitro*-Pflanzen.

Stock of plants for the rootstocks 55, 58, 96, 98 and 101 (1998).

GH = Gewächshaus, FZ = Freiland im Folienzelt, ST = Steckling, WS = Wurzelschnittling, 96, 97, 98 = 1996, 1997, 1998; IV = Pflanzen 1998 in der *In-vitro*-Vermehrung befindlich, IV Akk = akklimatisierte Pflanzen aus der *In-vitro*-Vermehrung.

6 Diskussion

Die Versuche 1996 bis 1998 haben gezeigt, daß eine Regeneration adulter Unterlagen möglich ist. Die angewendeten Regenerationsverfahren sind unterschiedlich gut geeignet und erbrachten eine unterschiedliche Anzahl an Regeneraten der einbezogenen Unterlagen. Allerdings ist der Erfolg der einzelnen Verfahren stark vom Genotyp abhängig.

Da eine Veredlungsstelle der Versuchsbäume nicht eindeutig über der Erdoberfläche zu erkennen war, hat sich die Methode der Wurzelschnittlingsvermehrung für die Regeneration der untersuchten adulten *Malus*-Unterlagen als Voraussetzung für alle weiteren Verfahren herausgestellt. Die gebildeten Sprosse dienten als Ausgangsmaterial für die Stecklingsvermehrung und die Sproßvermehrung *in vitro*. Letztere erbrachte in einem kurzen Zeitraum eine Vielzahl von regenerierten Unterlagen. Sie war in bezug auf diesen Parameter die effektivste Methode. Beobachtungen in den nächsten Jahren werden zeigen, ob sich die konventionell vermehrten Unterlagen und die *in vitro* erzeugten in ihrem Wuchsverhalten und ihrem Einfluß auf die Sorte unterscheiden. Ist dies nicht der Fall, so ist die *In-vitro*-Vermehrung der konventionellen vorzuziehen.

Die molekulargenetischen Untersuchungen haben bestätigt, daß es sich bei den Unterlagen um verschiedene Genotypen handelt (Abb. 9 und Abb. 10). Im weiteren werden die Regenerate der Unterlagen der verschiedenen Versuchsbäume deshalb als Klone bezeichnet.

6.1 Die Bewertung der Vermehrung über Wurzelschnittlinge für die Regeneration adulter Unterlagen

Die Vermehrung über Wurzelschnittlinge hat im Obstbau eine geringe Bedeutung, da das Wurzelsystem der Mutterpflanzen beschädigt wird. Handelt es sich bei dem Ausgangsmaterial um Verkaufspflanzen, so ist die Entnahme von Wurzelstücken nur bedingt möglich. Die Methode dient jedoch dazu, schnell, effizient und günstig genetisch identisches Material zu produzieren (DE HAAS und HILDEBRAND 1967). Sind andere konventionelle Vermehrungsverfahren (Steckling-, Steckholz- oder Abrißvermehrung) nicht anzuwenden, so wird im Obstbau auf die Vermehrung über Wurzelschnittlinge zurückgegriffen (ROBINSON 1975). Da die Veredlungsstelle der Versuchsbäume 1996 bis 1998 nicht zu erkennen war, mußten alle Versuche zur Regeneration der Unterlagen auf den Wurzelraum beschränkt werden. Die Methode der Vermehrung über Wurzelschnittlinge war die Voraussetzung für weitere konventionelle und *In-vitro*-Regenerationsversuche. Von jeder adulten Unterlage wurden mit Hilfe dieser Methode Regenerate erzeugt. Die prozentualen Ausbeuten dieser

Vermehrungsmethode waren je Unterlage verschieden. In den einzelnen Versuchsjahren variierte die Regenerationsrate zwischen 0 und 58,3 % (Tab. 9).

Auf diese genotypisch bedingten Unterschiede bezüglich der Vermehrungsmöglichkeit über Wurzelschnittlinge bei Apfelbäumen wird in der Literatur verwiesen. Es werden Regenerationsraten von 3 bis 93 % genannt (SHAW 1919, KEMMER und GISEVIUS 1948, MÖHRING in PASSECKER 1970). Ein direkter Vergleich mit den in der Literatur genannten Ergebnissen ist nicht möglich, da die Autoren jeweils andere Sorten oder Unterlagen in die Versuche einbezogen haben und keine bekannten Arbeiten an über 100jährigen Bäumen erfolgten.

Einfluß des Erntezeitpunktes und des Durchmessers der Wurzelschnittlinge auf den Regenerationserfolg

Um den Versuchszeitraum optimal auszunutzen, wurden die Wurzelschnittlinge 1996 bis 1998 im Frühjahr geerntet. Dies entspricht einer Empfehlung von ROBINSON und SCHWABE (1977a). Die Autoren weisen auf saisonale Effekte bei der Ernte von Apfelwurzelschnittlingen hin und empfehlen die frühe Frühjahrsernte. Der zu diesem Zeitpunkt in den Wurzelschnittlingen vorhandene hohe Gehalt an löslichen Zuckern und der gleichzeitig geringe Gehalt an Auxinen fördert die Regeneration. Dabei dienen die Kohlenhydrate als Reservestoffe für den Austrieb (ROBINSON und SCHWABE 1977b). Hohe Auxingehalte hingegen unterdrücken die Knospeninduktion und damit die Sproßbildung an den Wurzelschnittlingen (ROBINSON 1975).

Eine unbegrenzte Entnahme von Wurzelschnittlingen der Versuchsbäume war nicht möglich. Zwar sollte den Bäumen über drei Versuchsjahre soviel Wurzelmaterial wie möglich entnommen werden, ohne größere Schäden hervorzurufen aber ein Fällen und die Freilegung des gesamten Wurzelsystems zur Ernte war nicht zu realisieren. Zudem sollte der zur Verfügung stehende Versuchszeitraum (Beginn Frühjahr 1996) optimal ausgenutzt werden. Aus diesen Gründen wurde auf die von HILKENBÄUMER (1948), KEMMER und GISEVIUS (1948) und MAC DANIELS (1952) zusätzlich empfohlene Herbsternnte verzichtet.

Die Regenerationsraten im Oktober des jeweiligen Jahres unterscheiden sich je Klon zwischen den Versuchsjahren (Tab. 9). Dies ist zum einen auf die unterschiedlichen Erntetermine je Jahr zurückzuführen. Zum anderen wurden in jedem Jahr Wurzelschnittlinge unterschiedlicher physiologischer Konstitution geerntet. Histologische Untersuchungen bezüglich des Verholungsgrades wurden nicht durchgeführt.

Die Wurzelschnittlinge der Klone 53, 55 und 58 erbrachten im Versuchsjahr 1996 höhere Regenerationsraten als 1997 und 1998. Dies könnte auf die vor dem Stecken eingeschobene Kühllagerung im Jahr 1996 zurückzuführen sein (Tab. 1). Versuche in Rußland haben gezeigt, daß die besten Ergebnisse nach einer Kühllagerung der Wurzelschnittlinge von Apfelbäumen für 60 bis 120 Tage erzielt wurden (TUROVSKAY 1969 in ROBINSON 1975).

Hohe Regenerationsraten über Wurzelschnittlinge wurden für die Klone 1, 2 und 55 erzielt, wenn sie einem Durchmesser zwischen 0,1 und 1,0 cm zugeordnet waren. Die Versuchsergebnisse der Jahre 1996 bis 1998 bestätigen, daß die Regenerationsfähigkeit vom Durchmesser der Wurzelschnittlinge abhängt. Wurzelschnittlinge mit einem kleineren Durchmesser (< 1,5 cm) regenerieren zu höheren Prozentsätzen. Dies entspricht den Ergebnissen von KEMMER und GISEVIUS (1948), HILKENBÄUMER (1948) und ROBINSON (1975) bei Apfelwurzelschnittlingen.

Einfluß der Anzuchtbedingungen der Wurzelschnittlinge auf den Regenerationserfolg

Die Ergebnisse der Versuchsjahre 1996 bis 1998 zeigen, daß die prozentuale Ausbeute an lebensfähigen Wurzelschnittlingen im Gewächshaus und im Freiland je Klon voneinander verschieden ist. Eine Ausnahme bilden die Klone 2 (1997), 98 (1997) und 101 (1998). Dies bestätigt die Versuchsergebnisse von HARTMANN et al. (1997), die darauf hinweisen, daß die Regenerationsfähigkeit von Wurzelschnittlingen auf verschiedene Anzuchtbedingungen genotypabhängig ist.

Die Ergebnisse im Freiland liegen deutlich hinter denen im Gewächshaus zurück (Tab. 9 und Tab. 13). Daraus folgt, daß die kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus positiv auf die Regenerationsfähigkeit der Wurzelschnittlinge wirken. Aus diesem Grunde wurde die Anzucht im Gewächshaus gegenüber der im Freiland oder im kalten Kasten auch von HILKENBÄUMER (1948) und ROBINSON (1975) bevorzugt.

Der Einfluß der Steckposition der Wurzelschnittlinge auf den Regenerationserfolg

Horizontal in das Substrat gelegte Wurzelschnittlinge erbrachten in allen Versuchsjahren mehr Triebe als schräg abgesteckte Schnittlinge. Zur Gewinnung von Sproßmaterial zur Stecklings- und *In-vitro*-Vermehrung ist dies von Vorteil. Es wurde viel Material von wenigen Schnittlingen geerntet. Dies bestätigt die Versuche von ROBINSON (1975) mit Apfelschnittlingen.

Andererseits zeigte sich, daß schräges Abstecken für die Produktion von lebensfähigen Pflanzen sinnvoller ist. Jeweils ein Trieb konnte gezielt gefördert werden und die Schnittlinge bildeten Wurzeln, so daß die Versorgung der Sprosse gewährleistet war (Tab. 12, Tab. 16). HILKENBÄUMER (1948) und ROBINSON (1975) bevorzugten in ihren Versuchen bei Apfel aus diesem Grund die Methode des senkrechten Steckens. Die Förderung des Haupttriebes und die damit verbundene Eintriebigkeit wird von KEMMER und GISEVIUS (1948) als Bedingung für die Vermehrung über Wurzelschnittlinge gefordert. Die eigenen Versuche haben

gezeigt, daß beim schrägen Abstecken zusätzlich Triebe gebildet werden, die für weitere Versuche herangezogen werden können. Dies ist ein großer Vorteil bei der Gewinnung von wertvollem Material.

Beginn der Sproßbildung und Sproßursprung an den Wurzelschnittlingen

Die Wurzelschnittlinge im Gewächshaus und im Freiland begannen in allen Versuchsjahren zwei Wochen nach dem Stecken mit der Sproßbildung.

Dies stimmt mit den in der Literatur genannten Zeiträumen weitestgehend überein. ROBINSON (1975) beobachtete den Beginn der Sproßbildung nach acht Tagen. ROBINSON und SCHWABE (1977a) sowie MAC DANIELS (1952) stellten nach 10 bis 15 Tagen Sproßbildung an Apfelwurzelschnittlingen fest.

Sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland wurde der größere Teil der Sprosse, unabhängig vom Klon, im oberen Drittel der Schnittlinge gebildet. Es trat eine Polarität der Sproßbildung auf (Tab. 11 und Tab. 15), die in der Literatur vielfach diskutiert wird. MAC DANIELS (1952) beobachtete eine bevorzugte Sproßbildung am oberen (proximalen) Ende an Wurzelschnittlingen unterschiedlicher Länge. Die Wurzelschnittlinge in den Versuchen von ROBINSON und SCHWABE (1977a) trieben zu 75 % im oberen Drittel, während im unteren Drittel nur 7 % der Sprosse gebildet wurden. HARTMANN et al. (1997) führen die verstärkte Sproßbildung am proximalen Ende bei Wurzelschnittlingen auf die größere Nähe dieses Abschnittes zur Krone oder zur Verbindung zwischen Sproß- und Wurzelsystem am Mutterbaum zurück.

Wurzelneubildung an den Wurzelschnittlingen

Die Wurzelschnittlinge in den Versuchen der Jahre 1996 bis 1998 bildeten mit unterschiedlichem Erfolg Wurzeln an den Schnittlingen und am Sproß. Nicht alle gewählten Klassen der Wurzelbildung wurden besetzt (Tab. 12 und Tab. 16). Dies ist neben den klonalen Unterschieden mit der geringen Anzahl getriebener Wurzelschnittlinge einiger Klone zu erklären. Die Interpretation der Ergebnisse einzelner Klone wird aus diesem Grunde nicht durchgeführt.

Nach HARTMANN et al. (1997) ist eine Wurzelneubildung an Wurzelschnittlingen schwieriger als die Induktion von Adventivknospen. Öfter werden an der Basis der gebildeten Sprosse neue Wurzeln gebildet und seltener an der alten Wurzel. Die Wurzelbildung ist artabhängig. Es gibt Arten, die Wurzeln vor der Sproßbildung entwickeln, während andere zunächst Sprosse bilden. Im Gewächshaus bildeten 73,8 % aller Wurzelschnittlinge mit Sprossen neue Wurzeln an den Wurzelteilstücken oder am neugebildeten Sproß. Im Freiland waren es 68,7 % aller Wurzelschnittlinge mit Sprossen. An allen anderen Wurzelschnittlingen wurde keine Neuwurzelbildung beobachtet. Die Zahlen der Versuchsjahre 1996 und 1997 im

Vergleich mit dem aktuellen Pflanzenbestand 1998 (Abb. 11, Abb. 12) zeigen eine Abnahme der Pflanzenanzahl je Klon im weiteren Kulturverlauf. Die Abnahmen sind gering. Bei den Schnittlingen des Klones 2 hat eine Wurzelbildung am Wurzelteilstück oder am neugebildeten Sproß nach der Entnahme aus dem Vermehrungsbeet und im Topfsubstrat stattgefunden. Alle übrigen Differenzen weisen darauf hin, daß insbesondere die Wurzelschnittlinge, die keine neuen Wurzeln an den Schnittlingen gebildet hatten, weitere Kulturperioden nicht überlebten.

Dies bestätigt die Ergebnisse von KEMMER und GISEVIUS (1948). Sie zeigten in ihren Versuchen, daß neben einer Sproßbildung an den Wurzelschnittlingen neue Wurzeln gebildet werden müssen, damit lebensfähige Einzelpflanzen entstehen. Versuche von HARTMANN et al. (1997) ergaben, daß Wurzelschnittlinge mit Sproß, aber ohne Wurzelneubildung absterben. Ebenso haben Wurzelschnittlinge mit neu gebildeten Wurzeln, aber ohne Sproß keine Überlebenschancen.

Aber auch ein Teil der Wurzelschnittlinge mit zusätzlicher Wurzelbildung am Wurzelteilstück oder Sproß starb in den folgenden Jahren ab. Der Grund hierfür ist nach HARTMANN et al. (1997) in der ungenügenden Entwicklung des gebildeten Wurzelsystems zu suchen.

Einfluß des Alters der Mutterpflanzen auf die Regenerationsfähigkeit über Wurzelschnittlinge und die Juvenilität der Sprosse der Wurzelschnittlinge

Die Wurzelschnittlinge wurden in den Jahren 1996 bis 1998 von Bäumen entnommen, die einer Pflanzung von 1804 entstammen. Die Vermehrungsrate über Wurzelschnittlinge unterschied sich je Klon und lag zwischen 0 bis 58,3 % (Tab. 9 und Tab. 13). Vergleiche mit jüngeren Bäumen haben nicht stattgefunden. Die genannten Literaturangaben weisen darauf hin, daß die Ausbeuten mit entschieden jüngeren Bäumen genotypabhängig waren und nicht unbedingt über den in den hier beschriebenen Versuchen erzielten Ausbeuten lagen. Es hat sich gezeigt, daß es durchaus sinnvoll ist, Regenerationsversuche über Wurzelschnittlinge auch bei Bäumen dieses hohen Alters durchzuführen.

Demgegenüber haben Versuche von KEMMER und GISEVIUS (1948) gezeigt, daß die Vermehrung über Wurzelschnittlinge besonders bei alten Apfelbäumen versagt. In ihre Beobachtungen wurden 1-2 jährige, 4-6jährige Sämlinge und ältere Standbäume (ohne Altersangabe) einbezogen. ROBINSON (1975) stellte fest, daß mit zunehmendem Alter der Mutterpflanzen zwar die Anzahl der zur Verfügung stehenden Wurzelschnittlinge stieg, jedoch die prozentuale Ausbeute an getriebenen Schnittlingen sank. Das optimale Alter für die Vermehrung über Wurzelschnittlinge wird auf 4 Jahre festgesetzt und liegt damit deutlich unter dem der in die eigenen Versuche einbezogenen Versuchsbäume.

Daß die Wurzelschnittlinge von jüngeren Bäumen leichter zum Sproß- und Wurzelwachstum angeregt werden können, begründen HARTMANN et al. (1997) mit dem juvenileren Charakter der jüngeren Bäume. Wurzelschnittlinge sind mit zunehmendem Alter nicht mehr in der

Lage, ein neues Wurzelsystem auszubilden. Dieses ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Weiterkultur der Pflanzen.

Diese Aussagen wurden in den Versuchen nicht bestätigt. Trotz des hohen Alters der Versuchsbäume bildete ein großer Teil der geernteten Wurzelschnittlinge ein eigenständiges Wurzelsystem (Tab. 12, Tab. 16). Lebensfähige Pflanzen konnten herangezogen und erfolgreich weiterkultiviert werden (Abb. 11, Abb. 12). Dies ist auf die Art und Weise der Versuchsdurchführung und die damit verbundenen Versuchsbedingungen zurückzuführen.

An den Wurzelschnittlingen der Versuchsbäume wurde eine Vieltriebigkeit beobachtet. Es wurden im Durchschnitt zwischen einem und neun Sprossen je Wurzelschnittling gebildet. Dies bestätigt die Versuche von KEMMER und GISEVIUS (1948). Je älter die Mutterpflanzen waren, desto mehr neigten die Wurzelschnittlinge zur Vieltriebigkeit.

Eine Aussage bezogen auf die Juvenilität der Sprosse der Wurzelschnittlinge ist zum jetzigen Zeitpunkt nur in bezug auf die Bewurzelungsfähigkeit möglich. In den Versuchen zur Stecklingsvermehrbarkeit hat sich gezeigt, daß die Sprosse der Wurzelschnittlinge hohe Bewurzelungsergebnisse ergaben. Dies deutet auf eine Rejuvenilisierung hin und bestätigt die Ergebnisse von ROBINSON (1975) nach einer Stecklingsvermehrung mit Sprossen von Apfelwurzelschnittlingen. Die Dauer der juvenilen Phase und des Überganges in die generative Phase bei den regenerierten Unterlagen kann erst im Verlauf der folgenden Jahre beobachtet werden.

6.2 Die Bewertung von Veredlungen für die Regeneration adulter Unterlagen

Die in den Versuchen 1996 bis 1998 durchgeführten Veredlungskombinationen eigneten sich unterschiedlich gut für die Regeneration der adulten Unterlagen (Abb. 1 und Abb. 2). Zur Erstellung der am Originalstandort vorhandenen Sorten-Unterlagen-Kombinationen sind Veredlungen unersetzlich.

Die Möglichkeit der Veredlung auf Wurzelstücke

Die Veredlungen für alle acht einbezogenen Klone gelang, wenn Reiser der Sorte auf Wurzeln der jeweiligen Unterlagen kopuliert wurden. Die Anwachsrate waren klonabhängig. Die Klone 1, 2 und 55 brachten eine größere Anzahl lebensfähiger Veredlungen. Auf diese Weise wurden die ursprünglichen Sorten-Unterlagen-Kombinationen der Originalbäume wieder hergestellt (Abb. 1 und Abb. 2).

Bereits 1935 hat sich RIEBESEL die Veredlung von Reisern auf Wurzelstücke der gleichen Art/Sorte patentieren lassen. Bei verschiedenen Ziergehölzen (*Clematis*, *Paeonia*, *Wisteria* u.a.) werden Wurzelstücke als Unterlage genutzt, um die gewünschte Sorten-Unterlagen-Kombination herzustellen (PASSECKER 1970). MAURER (1939) bezeichnet dieses Verfah-

ren für die Vermehrung von Unterlagen als umständlich und daher wenig praktikabel. Zur Erstellung der Sorten-Unterlagen-Kombinationen der Versuchsbäume hat es sich im vorliegenden Fall als geeignet herausgestellt.

Die Eignung von Wurzelstücken als Propfpartner

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, daß nur bei drei Klonen (2, 53 und 55) mit Hilfe dieser Methode Wurzelstücke zur Sproßbildung angeregt wurden (Abb. 1 und Abb. 2). Die geringe Ausbeute ist einerseits auf die geringe Anzahl durchgeführter Veredlungen zurückzuführen. Andererseits weisen die Unterschiede darauf hin, daß diese Methode nicht für alle Klone geeignet ist. Bei der Auswahl der Wurzelstücke für die Veredlungen wurde darauf geachtet, daß sie nicht beschädigt waren und bei allen Klonen ähnlicher Qualität entsprachen.

Die geringe Anzahl an gelungenen Veredlungen ließ Versuche zur Freimachung der Wurzelstücke durch Tiefpflanzung nicht zu.

Versuche von OBENDIECK und LUCAS zeigten schon 1876, daß eine Sproßbildung aus Wurzelstücken nach der Verwendung als Reis möglich ist. Die Versuche wurden mit Birnensorten auf Quitte durchgeführt. ROBINSON (1975) brachte Wurzelstücke von Apfelsämlingen nach der Veredlung auf ausgewachsene Bäume zum Austreiben.

Die Verwendung von Wurzelstücken als Reis sollte in den Versuchen in erster Linie dazu dienen, Ausgangsmaterial für weitere Vermehrungsversuche heranzuziehen. Aus diesem Grunde führte auch ROBINSON (1975) die oben genannten Versuche durch.

Die Bedeutung der Vermehrungsherkunft der Unterlage und des Propfpartners

Die mit Hilfe der beschriebenen Vermehrungsverfahren regenerierten Klone wurden als Unterlagen und Propfpartner in die Veredlungsversuche einbezogen. Dies war einerseits notwendig, um die Original-Sorten-Unterlagen-Kombinationen wiederherzustellen. Andererseits dienten die Veredlungen dazu, die regenerierten Klone zum Wachstum und zur Neutriebbildung anzuregen. Die Anzahl an lebensfähigen Veredlungen war unterschiedlich. Das Verhalten der vegetativ vermehrten Unterlagen der Versuchsbäume als Veredlungspartner wird erst in den kommenden Jahren zu erkennen sein. Weitere Beobachtungen bezüglich des Einflusses der Unterlagen und der Standfestigkeit sind angestrebt.

Die *in vitro* vermehrten Klone 1, 2, 53, 55 und 58 zeigten 1998 nach der Akklimatisation im Freiland eine stärkere Verzweigung als die über Stecklinge oder Wurzelschnittlinge vermehrten Pflanzen. Diese Verzweigung wurde durch kürzere Internodien und einer größeren Anzahl von Seitentrieben bei den *In-vitro*-Pflanzen verursacht. Eine stärkere Verzweigung von der

Basis her wurde im ersten Jahr nicht beobachtet. Die Neigung zu Basistrieben wird erst in den kommenden Jahren zu beurteilen sein. Bei *in vitro* vermehrten Apfelunterlagen (M9, M25 und M27) wurde bereits von JONES und HADLOW (1989) eine verstärkte Basistriebbildung beobachtet. Für die Verwendung als Unterlage sind Basistriebe unerwünscht. Sie ermöglichen das Durchtreiben der Unterlage und erhöhen den Pflegeaufwand bei der Anzucht.

Im vorgegebenen Versuchszeitraum stand nur eine geringe Anzahl stecklingsvermehrter, *in vitro* vermehrter und über Wurzelschnittlinge vermehrter Pflanzen als Unterlage für Veredlungen zur Verfügung (Abb. 1 und Abb. 2), was Vergleichsprüfungen nicht zuließ. Dennoch war die Ausbeute an gelungenen Veredlungen sehr gut. KUNNEMANN (1991) führte solche Vergleichspflanzungen von *in vitro* vermehrten M26-Unterlagen und über Abrisse vermehrte Unterlagen durch. Es wurde kein abweichender Einfluß der *in vitro* vermehrten Unterlage auf die Fruchtqualität und -produktion im Vergleich zur abrissvermehrten Unterlage festgestellt. Im dritten Kulturjahr waren die Unterschiede bezüglich der Höhe, der Stärke und des Wurzelsystems (bei *in vitro* vermehrten Pflanzen zunächst jeweils höher) zwischen den verschiedenen Vermehrungsherkünften nicht mehr sichtbar. Ob sich diese Aussagen bezüglich der eigenen Versuche bestätigen, werden Beobachtungen der Veredlungen in den folgenden Jahren zeigen.

Auf Grund des geringen Wachstums der Wurzelschnittlinge wurde im Jahr 1998 erstmalig Veredlungen zwischen regenerierten Unterlagen über Wurzelschnittlinge und der Sorte 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' für den Klon 55 durchgeführt (Abb. 1). Die Veredlungen gelangen zu 88,9 %. Aussagen über das weitere Verhalten der Pflanzen im Versuchsbeet und deren weitere Entwicklung sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

'Rejuvenilisierung' durch Veredlungen

Ob ein 'Rejuvenilisierungseffekt' durch die Propfung von adultem Material (Wurzeln der Unterlagen, Reiser der Sorte) auf juvenile Unterlagen (2jährige Sämlinge von 'Bittenfelder', Wurzelschnittlinge, Stecklinge, *In-vitro*-Pflanzen) stattgefunden hat, wird erst in den kommenden Jahren zu beurteilen sein. HACKETT (1985) vertritt die Meinung, daß dieser 'Rejuvenilisierungseffekt' erst nach serieller Veredlung sichtbar wird.

Durch die Veredlung von Sprossen der Klone auf vorgetriebene Sprosse der Unterlage M9 sollte eine Verkürzung der juvenilen Phase erreicht werden. SCHMIDT (1986) erzielte auf diese Weise im Februar nach der Veredlung von Sämlingsreisern auf vorgetriebene M27 im Gewächshaus eine Blütenbildung bei 8 % der Pflanzen im ersten Jahr nach der Veredlung. Die Bonitur von Blüten spielt bei der taxonomischen Bewertung eine große Rolle (REMY und GRUBER 1993) und würde eine Zuordnung der in den eigenen Versuchen regenerierten Klone erleichtern (siehe Kapitel 6.6). Da die Grünveredlungen 1998 für einzelne Klone erst-

malig durchgeführt wurden, ist eine Aussage bezüglich der Blütenbildung zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

6.3 Die Bewertung der Verletzung der Baumwurzeln für die Regeneration adulter Unterlagen

Die Ergebnisse der Verletzungen der Baumwurzeln waren nicht befriedigend. Es wurde an allen Unterlagen Kallus- und Wurzelwachstum induziert. Nur die Wurzeln der Unterlage des Baumes 55 wurden zu Sproßwachstum angeregt (Tab. A 6.1).

Durch die Verwendung von IBS wurde die Wurzelbildung stark angeregt. Die Sproßbildung an den Wurzeln des Klonen 55 geht auf die Bildung von Adventivknospen zurück. Diese können nach einer Verwundung aus dem Kambium, der Endodermis oder dem Pericykel entstehen (MAC DANIELS 1952). Adventivknospen sind sekundäre Strukturen. Sie treten häufig an Stellen auf, die von ihrer primären Differenzierung her solche Organe nicht bilden, wie z.B. Knospen an Wurzeln (FINK 1980).

6.4 Die Bewertung der Stecklingsvermehrung für die Regeneration adulter Unterlagen

Die Stecklingsvermehrung eignet sich für die Regeneration adulter Unterlagen, wenn genügend Ausgangsmaterial in Form von Wurzelschnittlingen oder *In-vitro*-Pflanzen zur Verfügung steht. Da eine Vielzahl von Faktoren auf den Erfolg der Stecklingsvermehrung einwirken, ist es notwendig, Versuche in größerem Umfang anzulegen, in denen die Bedingungen für jeden Klon optimiert werden. Nur so sind hohe Bewurzelungsraten und eine große Anzahl lebensfähiger Pflanzen nach der Überwinterung zu erreichen. Bei Versuchen mit wertvollem Material sind diese Voraussetzungen selten gegeben.

Die in dem Versuchszeitraum 1996 bis 1998 erzielten Bewurzelungsraten bei der Stecklingsvermehrung unterschieden sich von Klon zu Klon und von Jahr zu Jahr. Die Bewurzelungsraten lagen zwischen 10 und 100 %. Die Ausfälle nach der Überwinterung schwankten von 0 bis 91,4 % (Tab. 17).

HOWARD et al. (1988) sowie OSTERC und SPETHMANN (1998) stellten bei Apfel genotypisch bedingte Unterschiede bezüglich der Stecklingsvermehrbarkeit fest. Dies bestätigen die eigenen Versuche in bezug auf die regenerierten Klone.

Die Unterschiede zwischen den Versuchsjahren, bezogen auf ein und denselben Klon, sind, da alle anderen Einflußgrößen konstant geblieben sind, auf den unterschiedlichen Stecktermin zurückzuführen. Dieser wird von SPETHMANN (1982) als stark artspezifisch bezeichnet und spielt beim Bewurzelungserfolg eine entscheidende Rolle. Für die Wahl des optimalen Stecktermins sind Versuche mit unterschiedlichen Erntezeitpunkten der Stecklinge notwendig. Das begrenzte Ausgangsmaterial 1996 bis 1998 ließ einen solchen Versuchsaufbau jedoch nicht zu. Nach PROCHOROVA et al. [1974 in BÄRTELS (1996)] ist der optimale Stecktermin bei Klonunterlagen des Apfels zur Zeit des stärksten Wachstums zu suchen. Aus diesem Grund wurden die Stecklinge im Juni geschnitten.

Die starken Ausfälle nach der Überwinterung sind auf zwei verschiedene Ursachen zurückzuführen:

- die nicht ausreichend optimierten Bedingungen und
- der nicht erfolgte Sproßzuwachs im Vermehrungsjahr.

Auf Grund des geringen Materials erfolgte lediglich eine Überwinterung im frostfreien Gewächshaus. Versuche von SPETHMANN (1985) haben gezeigt, daß die Überwinterungsbedingungen einen entscheidenden Einfluß auf das weitere Wachstum der Stecklinge haben. Nach PLIETZSCH (1997) sind die Überwinterungsbedingungen jedoch zweitrangig, wenn die Stecklinge noch im Vermehrungsjahr zu maximalem Sproßwachstum angeregt werden. Dies wurde bei Stecklingsversuchen mit verschiedenen Ziergehölzen festgestellt.

Ausgangsmaterial für die Stecklingsversuche waren in den Jahren 1996 bis 1998 Sprosse der Wurzelschnittlinge. Dieses juvenilere Material ließ sich - abhängig vom Klon - zu überwiegend hohen Prozentsätzen bewurzeln. Im Vergleich dazu wurden Stecklinge der Sorte der Versuchsbäume in die Bewurzelungsversuche einbezogen, deren Bewurzelung nicht erfolgreich war (Tab. 17). Diese Abhängigkeit der Bewurzelungsfähigkeit vom Alter der Mutterpflanze wird in der Literatur vielfach bestätigt (CLARK 1981, PASSECKER 1970 und 1977, OSBORNE 1986, SPETHMANN 1997).

Stecklinge von *In-vitro*-Pflanzen bewurzelten im Jahr 1997 zu 100 %. Mit Hilfe der *In-vitro*-Kultur erfolgt eine Rejuvenilisierung von adultem Material. Dies ist mit einem höheren Bewurzelungspotential verbunden (KESTER 1976, MULLINS et al. 1979, LYRENE 1981). Stecklinge von Apfel- und Birnenunterlagen bewurzelten nach einer *In-vitro*-Kultur zwei Jahre lang besser als die von vergleichbaren konventionell vermehrten Pflanzen (JONES und WEBSTER 1987). Mikrovermehrte Apfelbäume verloren ihren juvenilen Charakter im sechsten Beobachtungsjahr (ROSATI und GAGGIOLI 1987). Verliert sich die verbesserte Bewurzelungsfähigkeit, so handelt es sich nur um eine partielle Rejuvenilisierung (PIERIK 1990).

Die Überwinterungsergebnisse der Stecklinge von *In-vitro*-Pflanzen waren sehr gering (8,6 und 40 %, Tab. 17). Die Stecklinge stammten von Pflanzen, die 1997 akklimatisiert wurden. Auf Grund des physiologischen Zustandes der Mutterpflanzen konnte erst im September des gleichen Jahres mit der Stecklingsvermehrung begonnen werden. Dies bedeutete, daß die

Stecklinge nach erfolgreicher Bewurzelung nur einen geringen Zeitraum zur Abhärtung und zur Beendigung des Wachstums zur Verfügung hatten. Die geringen Überwinterungserfolge sind auf den zu späten Versuchstermin zurückzuführen. Der optimale Stecktermin liegt, wie die eigenen Versuche zeigen, viel früher im Juni.

6.5 Auswahl geeigneter Explantate für *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration

Eine erfolgreiche Regeneration der adulten Unterlagen über Wurzelschnittlinge war die Voraussetzung für die *In-vitro*-Versuche.

Für die Versuche zur Regeneration der Unterlagen stand unterschiedlich altes Ausgangsmaterial zur Verfügung. Die geeignetste Methode *in vitro* war die Sproßspitzenkultur, basierend auf den gebildeten Sprossen der Wurzelschnittlinge. Es handelte sich um juvenileres Material, da mit Hilfe des Wurzelschnittlingsverfahrens eine Rejuvenilisierung des ursprünglich adulten Material stattgefunden hatte. Dies zeigte sich in den guten Bewurzelungsraten der Stecklingsversuche (Tab. 17).

Versuche zur Regeneration über Wurzelstücke, Kallusstücke und Blattexplantate führten zu Kallus- nicht aber zu Sproßwachstum.

Wurzelstücke

Wurzelstücke von *in vivo* gebildeten Wurzeln wurden im Versuchszeitraum erfolgreich desinfiziert und etabliert. Eine Regeneration der Unterlagen war mit Hilfe dieser Explantate nicht möglich. Die Gründe für das Mißlingen sind vielfältig. Einige werden im folgenden diskutiert.

Die Regeneration von Sprossen aus Wurzelstücken oder intakten Wurzeln mit Sprossen wird vielfach beschrieben. Ausgangsmaterial waren stets *in vitro* gebildete Wurzeln, die zu Kallus- oder Sproßwachstum angeregt werden sollten (LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. 1991a). *In vivo* gebildete Wurzeln wurden nicht zu Versuchen genutzt. Dies ist ein großer Unterschied zu den eigenen Versuchen.

Daß das Alter einen entscheidenden Einfluß auf die Regenerationsfähigkeit von *In-vitro*-Wurzeln hat, fanden SON und HALL (1990) bei *Populus* heraus. 60 Tage alte Wurzeln erbrachten die größte Anzahl Sprosse, im Gegensatz zu vorzeitig geernteten Wurzelstücken.

Eine Altersbestimmung der *in vivo* gebildeten Wurzeln wurde nicht durchgeführt. Die im Herbst geernteten Wurzelstücke waren nach der Verletzung im vorhergehenden Frühjahr gebildet worden. Im Vergleich zu den im Frühjahr geernteten Wurzelstücken setzte die Kallusbildung sehr viel früher ein (Kapitel 3.2.1). Das im Herbst geerntete Material war definitiv ein halbes Jahr alt und weniger stark verholzt als das im Frühjahr geerntete. Die früher einset-

zende Kallusbildung ist wahrscheinlich auf das geringere Alter und den geringeren Verholungsgrad zurückzuführen.

Der Einsatz verschiedener Auxine und Cytokinine führte nicht zur Sproßbildung. Erhöhte Konzentrationen von 2,4 D ergaben in den Versuchen 1996 verstärktes Kalluswachstum an den etablierten Wurzelstücken. Die von NEUMANN (1995) empfohlene Überführung auf hormonfreies Medium führte nicht zu Sproßwachstum. Die Anzahl der Subkulturen auf hormonhaltigem Medium hatte keinen Einfluß auf das Regenerationsergebnis. Auch der versetzte Beginn der Hormonbehandlung nach vorhergehender Kultur auf hormonfreiem Medium blieb ohne Regenerationserfolg. Der Einsatz weniger stabiler Auxine (IBS) führte zu Kalluswachstum. Allerdings wurde eine Regeneration von Sprossen nicht erzielt (Tab. 18).

Die Verwendung von TDZ in geringen Konzentrationen (0,1 und 0,2 mg/l) blieb ohne Erfolg auf eine Sproßregeneration. Ein Wechsel auf ein BAP-haltiges oder hormonfreies Medium führte nicht zu Sproßwachstum. Die von MOK et al. (1987) beobachtete Organogenese nach dem Einsatz von TDZ konnte nicht bestätigt werden. In den eigenen Versuchen wurde nur eine starke Kallusproduktion beobachtet. Nach HUETTEMANN und PREECE (1987) wirkt diese in vielen Fällen einer Sproßbildung entgegen. Es ist nicht auszuschließen, daß die Konzentrationen der gewählten Phytohormone nicht optimal auf den Genotyp abgestimmt waren. Dies ist nach MOK et al. (1987) eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen von Regenerationsversuchen *in vitro*.

Kallusstücke

Die Regeneration der adulten Unterlagen über *in vivo* gebildeten Kalli war nicht erfolgreich. Es wurde weder Kallus- noch Sproßwachstum erzielt.

Die Versuche zur Regeneration der Unterlagen über Kalli waren zu unspezifisch. Eine größere Variationsbreite bezüglich der Kulturbedingungen, der Medienwahl und der Hormonzusätze ist notwendig, um die Sproßregeneration zu forcieren. Die Versuche wurden 1997 abgebrochen, da die genetische Konstitution der evtl. erzeugten Sprosse aus Kalli nicht mit der des Ausgangsmaterials übereinstimmen muß. Arbeiten bei Apfel haben gezeigt, daß nach einer Kalluskultur Sprosse mit aneuploidem Charakter auftraten (MEHRA und SACHDEVA 1979). Allerdings gibt es auch Arten (z.B. Eukalyptus), bei denen solche Ploidieverschiebungen nicht vorkommen. Die Kalluskultur wird vielfach genutzt, um genetische Variabilität zu erzeugen. Sie dient in den seltensten Fällen dazu, eine bestimmte genetische Konstitution zu erhalten und zu vermehren. Nach BAJA (1986) sollten Kalluskulturen genutzt werden, wenn Quantität und nicht Qualität zählt.

Ziel der hier beschriebenen Versuche war es, die Unterlagen der Versuchsbäume genetisch identisch zu reproduzieren. Aus diesem Grund und da die Ergebnisse der Regenerationsversu-

che über Kallusstücke 1996 nicht befriedigend waren (Kapitel 5.2.2), wurden sie in den Versuchsjahren 1997 und 1998 nicht wiederholt. Wären 1996 Sprosse aus der Kalluskultur hervorgegangen, so hätten sie bezüglich ihrer genetischen Konstitution untersucht werden müssen.

Sprosse

Die Regenerationsversuche *in vitro* waren am erfolgreichsten, wenn die Sproßspitzen der Wurzelschnittlinge der jeweiligen Versuchsjahre genutzt wurden. Es ist auf diese Art und Weise möglich, adulte Unterlagen *in vitro* zu vermehren, wenn eine Wurzelschnittlingsvermehrung vorgeschaltet wird. Die Sprosse von sechs der einbezogenen acht Unterlagenklone wurden erfolgreich *in vitro* etabliert und vermehrt. Fünf Klone wurden *in vitro* bewurzelt und mit Erfolg akklimatisiert. Die Dauer einer Subkultur betrug vier Wochen. Diese kurze Vermehrungsphase und die erfolgreiche Etablierung und Vermehrung der Sprosse der Klone führte zu Versuchen zur Optimierung der Vermehrungsbedingungen.

Die **Etablierung** der Sprosse der Wurzelschnittlinge gelang im Versuchszeitraum für die Klone 1, 2, 53, 55, 58 und 96. Der Etablierungserfolg war klonabhängig und schwankte zwischen 25 und 77,8 % (Tab. 20). Die Etablierung von Sproßspitzen der Sorte 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' gelang nicht. Die Sprosse verbräunten und starben ab.

THEILER-HEDTRICH und THEILER-HEDTRICH (1990) bezeichnen die Etablierung von Apfelsprossen als schwierig. Diese Schwierigkeiten, die besonders bei der Etablierung von Sprossen alter Obstbäume auftreten, sind darin begründet, daß die Mutterbäume über Jahre oder Jahrzehnte nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt wurden. Bakterien und Pilze wurden nicht bekämpft und hatten die Möglichkeit, sich gut zu etablieren (LAIMER da CÂMARA MACHADO 1991b). Dies trifft auf die Versuchsbäume zu. Seit mehreren Jahrzehnten werden sie nicht mehr obstbaulich genutzt. Bakterien und Pilze etablierten sich in Sproß und Wurzel. Die aus den Wurzelschnittlingen entsprungenen Sprosse wurden nicht auf Bakterien und Pilzbefall untersucht. Die Ausfallraten *in vitro* weisen jedoch auf eine verstärkte Kontamination hin (Tab. 20).

Die häufigsten Schwierigkeiten bei der Etablierung sind auftretende Infektionen durch endogene Bakterien und Phenole. Dies kann zu 100 %igem Ausfall führen (LAIMER da CÂMARA MACHADO et al. 1991a). Bedingt durch hohe Kontaminationen konnten JONES et al. (1979) nach der Etablierung von fünf Apfelsorten aus East Malling nur 10 - 30 % des Ausgangsmaterials für den Aufbau einer Kultur verwenden. Diese geringen Raten wurden trotz vorgeschaltetem „leaching“ für eine Stunde erreicht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen geringere Ausfallraten als die in der Literatur genannten. Nur die Sprosse des Klones 53 fielen zu 75 % nach der Etablierung aus. Alle anderen Klone

wurden mit über 50 %igem Erfolg etabliert (Tab. 20). Dies ist auf die verwendeten Etablierungsbedingungen zurückzuführen.

Durch die Vermehrung über Wurzelschnittlinge erfolgte eine Rejuvenilierung. Die für die Etablierungsversuche gewonnenen Sproßspitzen waren juveniler als die Sproßspitzen der Sorte 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Etablierung sind u.a. auf den Juvenilitätsstatus zurückzuführen. Eine Verbesserung des Etablierungserfolges des adulten Material ist möglich, indem die Zweige vorgetrieben werden. LAIMER et al. (1988a) erreichten hierdurch eine Etablierung von Sprossen der alten Lokalsorte *Malus domestica* 'Graf Uhlhorn August-Kavil'. Weitere Untersuchungen wären nötig, um die Sorte 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' *in vitro* zu etablieren. Da dies jedoch in der Aufgabenstellung sekundär war, wurde auf sich anschließende Versuchsreihen verzichtet. Für die Erstellung der Sorten-Unterlagen-Kombination wäre es von Vorteil, *in vitro* vermehrtes Material der Sorte zur Verfügung zu haben. Material des gleichen 'Juvenilitätsstatus' und der gleichen Vermehrungsherkunft wäre dann als Unterlage und als Sorte vorhanden.

Ein zweistündiges „leaching“ der Sprosse der Klone bewirkte in den Versuchen 1996 bis 1998 klonabhängig unterschiedlich stark auftretende Kontaminationen. Die an der Oberfläche der Explantate haftenden Verunreinigungen wurden zum Teil ausgewaschen. Dies bestätigt die von BLOCK (1993) bei der Etablierung der Apfelunterlage M9 erzielten Ergebnisse. Die Kontaminationsrate war für die Sprosse der Klone durch die von HANKE (1996) empfohlene Vorkultur (Kühlphase, Medienzusätze, Kapitel 4.2.1) unterschiedlich hoch. Eine Phenolbildung und Verbräunung wurde unterdrückt.

Die **Vermehrung** der etablierten Sprosse wurde zunächst auf einem von KRIEGHOFF und HANKE (1994) empfohlenen Medium (M2, Tab. 6) durchgeführt. In den ersten fünf Subkulturen waren die erzielten Sproßanzahlen je Klon unterschiedlich und sehr gering. Sie schwankten durchschnittlich zwischen 1,5 und 2,5 (Tab. 21). Es erfolgte ausschließlich Axillarsproßbildung.

Die geringen Sproßanzahlen sind auf wiederkehrenden Bakterienbefall in den Subkulturen zurückzuführen. JONES et al. (1979) erhielten nach mehreren Subkulturen bei Apfelsprossen keine sterilen Kulturen. Nach mehreren Passagen *in vitro* traten in den Sproßkulturen von Apfelunterlagen bei JAMES und THURBON (1981) wiederholt Infektionen auf. In den eigenen Versuchen war dies besonders deutlich bei den Sprossen des Klones 53 zu beobachten. Erst nach der achten Subkultur *in vitro* konnten für alle Klone sterile Kulturen aufgebaut werden. Es wurde mit den Versuchen zur Optimierung des Vermehrungsmediums für die einzelnen Klone begonnen. Die Sproßanzahlen je Klon auf dem Kontrollmedium (M2) unterschieden sich nach den ersten fünf Subkulturen (Tab. 21) und nach der Durchführung der Versuche zur Optimierung der Medien (Tab. 22). THEILER-HEDTRICH und THEILER-HEDTRICH (1990) führen dies auf die schwierige Etablierung von Apfelsprossen zurück. Es ist möglich, daß bis zu einem Jahr vergeht, bis hohe Sproßanzahlen erzielt werden. WEBSTER und JONES (1989) erreichten erst bei fünf bis neun Jahre alten Linien von M9 die höchsten

Sproßanzahlen. BLOCK (1993) benötigte 12 Subkulturen, um ein zufriedenstellendes Sproßwachstum bei M9 zu erzielen. Die erhöhten Sproßanzahlen sind auf einen Rejuvenilisierungseffekt durch die wiederholte Subkultivierung zurückzuführen. Dies äußert sich in einer verstärkten Sproßbildung und einer erhöhten Bewurzelungsfähigkeit (GREENWOOD 1987, PIERIK 1990).

Nach Abschluß der Versuche zur Optimierung des Mediums lagen die durchschnittlichen Sproßanzahlen auf den empfohlenen Medien zwischen 3,6 und 4,9 (Tab. 22). Eine deutliche Abhängigkeit zwischen Klon und Sproßanzahl war zu erkennen. Diese Zahlen liegen mit Bereich derer, die in der Literatur genannt werden. HANKE (1994) hebt in ihren Untersuchungen den Einfluß des Genotypes bei *Malus* auf die Sproßanzahl deutlich hervor. Es wurden 6 Unterlagen, 10 Sorten und eine Wildart von *Malus* in die Versuche einbezogen. Die Spannweite der erzielten Sproßanzahl lag zwischen 1,2 bis 6,3, abhängig vom Genotyp. Die erzielten Sproßanzahlen je Subkultur für M9 lagen in Versuchen von JAMES und THURBON (1981) zwischen 2 und 4,5.

Für die Klone 1, 2, 55 und 58 wird das Medium 1 (Tab. 6) für die Vermehrung empfohlen. Der Unterschied zu den anderen Vermehrungsmedien war nicht in allen Fällen statistisch abgesichert. Das Medium 1 lieferte tendenziell die größte Anzahl Sprosse. Dieses Medium ist ein modifiziertes MS-Medium und enthält als einziges Phytohormon BAP (1,0 mg/l). Cytokinine stimulieren gewöhnlich die Sproßbildung und unterdrücken das Sproßwachstum (FASOLO-FABBRI-MAKAVASI und PREDIERI 1990). Der alleinige Zusatz von Cytokinin in Form von BAP wird für verschiedene Apfelunterlagen und -sorten von JAMES und THURBON (1981), LÊ (1985), KUNNEMANN (1988), SINGHA (1989) und SUTTER und LUZA (1993) empfohlen. Gute Vermehrungsraten wurden bei der Verwendung von Cytokinin und Auxinen in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 mg/l für die Apfelunterlage M26 erzielt (JONES et al. 1977).

Dies konnten die eigenen Versuche nicht bestätigen. Der Zusatz von Auxin (IBS 1,0 mg/l, M 2) oder die Kombination (M3) von Cytokinin (0,5 mg/l), Auxin (0,2 mg/l) und Gibberellin (0,5 mg/l) hatte keinen signifikanten fördernden Einfluß auf die Sproßanzahl. Versuche von WELANDER (1985) ergaben, daß bei der Apfelsorte 'Akerö' der Ausschluß von Auxinen steigernd auf die Sproßzahl wirkte. Dies gilt ebenfalls für die durchgeführten Versuche. Der Klon 53 erzielte tendenziell die größte Anzahl Sprosse auf dem Medium 2. Die Unterschiede zu den anderen Medien waren nicht statistisch abgesichert. Daß die Reaktion auf den Zusatz bestimmter Phytohormone genotypabhängig ist, wird in der Literatur vielfach bestätigt. Für die Produktion einer optimalen Anzahl qualitativ guter Sprosse ist ein auf den Genotyp abgestimmtes Verhältnis von Cytokinin und Auxinen sowie evtl. weiteren Zusätzen notwendig (DUNSTAN et al. 1985).

Die Sproßlänge der Klone 53, 55 und 58 wurde signifikant erhöht, wenn dem Medium Gibberellinsäure zugesetzt wurde. Die Klone 1 und 2 bildeten tendenziell die längsten Sprosse auf diesem Medium (M3, Tab. 6). Dies ist dadurch begründet, daß Gibberelline in erster Linie die

Sproßstreckung beeinflussen. Die Wirkung der Gibberelline in bezug auf diesen Parameter ist denen der Auxine überlegen. Jedes Phytohormon kann eigenständig auf die Sproßstreckung wirken. Die Kombination beider kann synergistische Effekte hervorrufen (KRAMER und KOZLOWSKI 1960).

Für die Regeneration der adulten *Malus*-Unterlagen war es zunächst wichtig, eine große Anzahl an Sprossen zu produzieren. Die erzielten Sproßanzahlen auf den empfohlenen Medien waren zufriedenstellend bei ausreichender Sproßlänge. Wären die Sproßlängen geringer ausgefallen, so wäre es notwendig gewesen, ein Medium mit dem Zusatz von Gibberellinen in den Kulturverlauf einzuschieben. Der Gebrauch von sogenannten Sekundärmedien ist bei Apfel erfolgreich angewendet worden (FASOLO-FABBRI-MAKAVASI und PREDIERI 1990).

Die Sprosse der Klone wurden ausschließlich auf Medien kultiviert, die als Zuckerquelle Sorbitol enthielten. Ein Vergleich mit saccharosehaltigen Medien wurde nicht durchgeführt. In Apfelgeweben ist Sorbitol die Haupttransportform des Zuckers und das erste Produkt der Photosynthese (PAWLICKI und WELANDER 1995). Die Bevorzugung dieser Zuckerquelle ist genotypabhängig. Die Vermehrungsrate und die Sproßlänge sind jedoch direkt an die Zuckerquelle gekoppelt (MONCOUSIN et al. 1992).

Die Sprosse der einzelnen Klone ergaben *in vitro* unterschiedliche **Bewurzelungsraten**. Die Spannweite der Bewurzelungsprozente lag zwischen 63 und 100 % (Abb. 4, Tab. 25). Auf diese genotypischen Unterschiede wird in der Literatur vielfach verwiesen. DUNSTAN (1981) erzielte für die Unterlagen M7, M26, M111 und M4 Bewurzelungsraten zwischen 85 und 97 %, DE KLERK et al. (1997) für die Unterlage Jork9 92 %. Dies deckt sich mit den eigenen Versuchsergebnissen. Die Bewurzelungsraten für M20 lagen bei KUNNEMANN und ALBERS (1992) mit 15 bis 30 % und die für die Unterlage M9 bei JAMES und THURBON (1979) mit 60 % unter den eigenen Versuchsergebnissen.

Die Bewurzelungsrate der Klone 1 und 2 unterschieden sich nicht nach 9, 10 oder 11 Subkulturen *in vitro* (Tab. 25). Zwischen der 7. und 8. Subkultur gab es keine Unterschiede zwischen den Klonen 55 und 58 (Abb. 4). Die Bewurzelungsraten des Klones 55 der Subkultur 20 (14.08.1998) unterschieden sich signifikant von denen der Subkulturen 18 (11.05.1998) und 19 (29.06.1998) (Tab. 25).

Im Gegensatz dazu beobachtete BLOCK (1993) bei M9 einen Anstieg der Bewurzelungsrate mit zunehmender Subkultivierung von 20 % (nach 14 Subkulturen) auf 93 % (nach 22 Subkulturen). Den gleichen Effekt beobachteten SRISKANDARAJAH und MULLINS (1981) bei Sprossen der Sorte 'Granny Smith'. Dies wird auf einen mit der Anzahl der Subkulturen zunehmenden Grad der Rejuvenilisierung zurückgeführt (WEBSTER und JONES 1989). Es ist möglich, daß die Anzahl der durchgeführten Subkulturen in den eigenen Versuchen noch nicht ausreichend ist, um einen Rejuvenilisierungseffekt nachweisen zu können.

ZIMMERMANN (1984) weist darauf hin, daß dieser Effekt vom Genotyp abhängig ist. Von dem Autor untersuchte Sprosse von M9 bewurzelten sich mit zunehmender Subkultur mit ge-

ringerer Ausbeute. Dies bestätigen die Bewurzelungsversuche des Klones 58. Die Bewurzelungsraten nahmen von Subkultur 18 bis 20 signifikant ab (Tab. 25).

Die durchschnittlich erzielte Wurzelanzahl je Sproß war in den durchgeführten Versuchen je Klon verschieden. Sie lag bei vergleichbarer Medienzusammensetzung zwischen 2,4 und 8,1 und deckt sich weitestgehend mit den Literaturangaben. Die Wurzelanzahl, die einen guten Bewurzelungserfolg charakterisiert, wird in der Literatur jedoch unterschiedlich diskutiert. DE KLERK et al. (1997) bezeichnen eine Wurzelanzahl von 8 bei Jork9 als gering und eine von 11 als ausreichend. KRIEKEN et al. (1993) erzielten zwischen 4,5 und 8 Wurzeln je Sproß bei Sprossen der Unterlage Jork9. Für PAWLICKI und WELANDER (1995) sind Sprosse von Jork9 dann gut bewurzelt, wenn die Wurzelanzahl je Sproß über 6 liegt. Die Bewertungsmaßstäbe werden unterschiedlich hoch angesetzt. Neben diesen Unterschieden innerhalb eines Genotypes sind auch solche zwischen den Genotypen bekannt. KUNNEMANN (1988) erzielte für die Sprosse der Unterlage M20 je Sproß zwischen 2,4 und 5,8 Wurzeln.

Die Wurzellänge ist nicht entscheidend für den Bewurzelungserfolg. Lange Wurzeln sind störend bei dem Übergang von der *In-vitro*-Phase in die Akklimatisationsphase. Sie brechen beim Pikieren sehr oft ab. Eine größere Anzahl kürzerer Wurzeln ist leichter in das Substrat zu überführen. Dieser Parameter spielt bei dem Vergleich der Verfestigungsmittel eine Rolle.

Der Bewurzelungserfolg der Klone 55 und 58 wurde 1997 in Abhängigkeit vom Verfestigungsmittel bewertet. Mit zunehmendem Anteil von Gelrite in einer der Bewurzelungsphasen nahm der Bewurzelungserfolg für beide Klone signifikant ab (Abb. 5). Es wurden signifikant weniger Wurzeln gebildet und die Wurzellänge stieg signifikant an (Tab. 24). Die Kallusbildung und die Vitrifizierung der Sprosse nahm zu.

SCHERER et al. (1992) stellten fest, daß Gelrite einen deutlich höheren Salzgehalt als Agar hat. Hohe Salzgehalte fördern die Kallusproduktion und verringern den Bewurzelungserfolg (WELANDER 1983; HUTCHINSON 1984). Dies war deutlich bei den auf Gelrite bewurzelten Klonen zu erkennen. Dem negativen Einfluß des Salzgehaltes kann durch die Reduzierung der Makronährstoffgehalte im Medium entgegengewirkt werden. Aus diesem Grunde werden für Bewurzelungsmedien nur die Hälfte der Makronährstoffe empfohlen. Dies gilt auch für Bewurzelungsmedien für *Malus* (SINGHA 1989, KÜHNE et al. 1988, AI-PINK et al. 1995 u.a.).

In den Versuchen wurde auf Medien mit halber Makronährstoffkonzentration bewurzelt (Tab. A 2.2.4). Das eingesetzte Gelrite hat den Effekt des geringeren Salzgehaltes wieder aufgehoben. Die Zusammensetzung des Verfestigungsmittels wirkte auf die Wurzelanzahl und Wurzellänge. Die Nährstoffzusammensetzung von Gelrite förderte das Längenwachstum der Wurzeln und reduzierte die Wurzelanzahl. Für die Bewurzelung der Klone wird Gelrite aus diesen genannten Gründen nicht empfohlen. Trotz der aufgeführten Vorteile (Kapitel 3.2) hat es bei den verwendeten Klonen zu signifikant geringeren Bewurzelungserfolgen geführt.

Die **Ex-vitro-Bewurzelung** der Sprosse der Klone 1 und 2 erfolgte 1998 nach der 9. Subkultur. Die Sprosse des Klones 1 wurden zu 13,3 % und die des Klones 2 zu 60,8 % bewurzelt und akklimatisiert. Im Vergleich zu den *in vitro* bewurzelten Sprossen sind die Bewurzelungsraten deutlich geringer. Dies ist möglicherweise auf noch nicht ausreichende Subkultivierung *in vitro* zurückzuführen. Versuche von WEBSTER und JONES (1989) haben gezeigt, daß die Bewurzelungsraten *ex vitro* mit zunehmender Subkultur *in vitro* gesteigert werden konnten. Erst nach 9jähriger Kultur *in vitro* wurden für die Sprosse der Unterlage M9 Bewurzelungsraten zwischen 90 und 100 % *in vivo* erzielt. Die Autoren führen dies auf den zunehmenden Rejuvenilisierungseffekt *in vitro* zurück. Bei den Sprossen der Unterlage M9 tritt dieser Effekt erst nach langer Kulturdauer auf (BLOCK 1993). Dieser verspätete Verjüngungseffekt könnte die Ursache für die geringen Bewurzelungsprozente der Sprosse der Klone 1 und 2 sein.

Es ist ebenso möglich, daß der geringe Bewurzelungserfolg auf unzureichende Akklimatisationsbedingungen für unbewurzelte Sprosse zurückzuführen ist. *In-vitro*-Pflanzen unterscheiden sich morphologisch von Pflanzen, die unter unsterilen Bedingungen herangezogen werden. Sie haben kleinere dünnere Blätter, eine dünneres Palisadengewebe und eine geringere Kutikularentwicklung. Der Mechanismus der Stomataschließung ist unterentwickelt (DE BERGH 1991). Diese Unterschiede werden in der Akklimatisationsphase langsam aufgehoben. Werden unbewurzelte Sprosse *in vivo* überführt, so müssen sie neben diesen morphologischen Veränderungen zusätzlich die Bewurzelung erreichen. Veränderte Akklimatisationsbedingungen würden die Bewurzelungsprozente der Sprosse der Klone 1 und 2 eventuell erhöhen.

Bezogen auf die Anzahl bewurzelter Sprosse lag der **Akklimatisations**erfolg der Klone 55 und 58 zwischen 50 und fast 90 %. Wurde der Bezug zur Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse gewählt, so lag der Akklimatisationserfolg deutlich darunter. Die Spannweite betrug 8 bis 84 %. Dies ist auf den Einfluß des Verfestigungsmittels zurückzuführen, das während der Bewurzelung verwendet wurde. Mit zunehmendem Anteil von Gelrite sank die Bewurzelungsrate. Weniger Sprosse wurden erfolgreich bewurzelt und damit in die Akklimatisationsphase überführt. Die Ergebnisse relativieren sich, wenn der Bezug zu den bewurzelten Sprossen gewählt wird. Der Einfluß des Verfestigungsmittels wird dann nicht berücksichtigt.

Unabhängig vom Klon und dem Verfestigungsmittel im Medium sind während der Akklimatisationsphase 1997 zwischen 11 und 16 % der Sprosse ausgefallen. In der Literatur werden für verschiedene *Malus*-Sorten und -Unterlagen Ausfallraten zwischen 5 und 40 % genannt (JONES et al. 1979, LÊ 1985, DUNSTAN 1981). Die erzielten Akklimatisationserfolge in den durchgeführten Versuchen können daher als gut bezeichnet werden. Allerdings wurden die Sprosse des Klones 58 nur zu 50 % erfolgreich akklimatisiert, wenn die Bewurzelung auf mit Gelrite verfestigtem Medium durchgeführt wurde (Tab. 27, Bezug Anzahl bewurzelter Sprosse). Die Sprosse waren stark vitrifiziert. Die Vitrifikation wird u.a. durch das verwendete Verfestigungsmittel bedingt (HUETTEMANN UND PRESSCE 1993). Dies wirkt sich

nachteilig auf die Qualität der Sprosse und den Akklimatisationserfolg aus (DE BERGH 1991).

Der Erfolg der Akklimatisation für die Sprosse der Klone 1, 55 und 58 unterschied sich 1998 abhängig vom Beginn der Überführung *in vivo* (Tab. 28). Die Akklimatisationsraten lagen zwischen 77 und 100 %. Die Ausnahme bildeten die Sprosse des Klones 58. Hier wurden im Juni 1998 nur 56 % der bewurzelten Sprosse erfolgreich akklimatisiert. Dies ist auf suboptimale Bedingungen während der Akklimatisationsphase zurückzuführen, worauf der Klon 58 mit großen Ausfallraten reagierte. Dies verdeutlicht, daß die Reaktion auf die Akklimatisationsbedingungen genotypisch verschieden ist. Der Klon 58 erreichte außerdem zu jedem Termin den geringsten Akklimatisationserfolg.

Die Sprosse der anderen Klone erzielten ebenfalls die geringsten Akklimatisationserfolge zum ersten Überführungstermin. Fehler in der Kulturführung sind die Ursache für die geringen Ausbeuten. Die zu schnelle Absenkung der Luftfeuchte führte zu erhöhten Ausfallraten.

Eine Abnahme des Akklimatisationserfolges mit fortschreitendem Termin konnte 1998 statistisch nicht nachgewiesen werden. Im September 1998 wurde ein großer Anteil der bewurzelten Sprosse erfolgreich *in vivo* überführt. Ein Nachteil der späten Überführung ist der geringe Sproßzuwachs im Akklimatisationsjahr. Schon wenige Monate Verschiebung in bezug auf den Abhärtungstermin können zu einer verminderten Wuchsleistung führen (WALDENMAIER 1991).

Die Akklimatisation ist oft der limitierende Faktor in der *In-vitro*-Vermehrung. Die Strategien der Akklimatisation müssen deshalb an den Genotyp angepaßt werden (DONNELLY 1993).

Blätter

Die Regeneration der Klone über Blattsegmente war nicht erfolgreich. Es wurde kein Sproßwachstum induziert. Kallusbildung fand verstärkt an den Blatträndern und der Oberseite statt (Tab. 29). Die Kallusgröße lag zwischen 4 und 10 mm (Tab. 30). Als Ausgangsmaterial standen voll entwickelte Blätter der regenerierten Sprosse der Wurzelschnittlinge zur Verfügung.

Die Regeneration über Blattsegmente wird vielfach genutzt, um somaklonale Variation zu induzieren. Das regenerierte Material kann als Ausgangsmaterial für Transformationsversuche dienen (THEILER-HEDTRICH und THEILER-HEDTRICH 1990, KUNNEMANN 1990, HANKE 1994, YEPES und ALDWICKLE 1994). Steht kein anderes Material für Regenerationsversuche zur genetisch identischen Vermehrung bestimmter Genotypen zur Verfügung, so kann auf Blätter zurückgegriffen werden. Die erzeugten Regenerate sind auf ihre genetische Identität zu untersuchen und auftretende Variationen aus weiteren Versuchen auszuschließen.

Die Versuche wurden nicht weitergeführt, da sich die Sproßspitzenkultur vielversprechend entwickelt hatte. Eine genetisch identische Vermehrung der Klone wurde auf diese Art und Weise gewährleistet. Es schien sinnvoller, diese Verfahren zu optimieren, als weitere zu erproben. Zudem mußten angesichts der zeitlich begrenzten Versuchsdauer Prioritäten gesetzt werden.

6.6 Möglichkeiten zur Bewertung der regenerierten Unterlagen

Zur Bewertung der regenerierten Unterlagen wurden morphologische und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Die Beurteilung des Virusstatus erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Testes.

Morphologische Untersuchungen

In die morphologischen Untersuchungen wurden die Boniturmerkmale Blattform, Blattspitze, Blattrand, Drüsen am Blattrand, Behaarung und Nebenblätter einbezogen. Diese Merkmale eignen sich unterschiedlich gut zur Unterscheidung von Genotypen. Zum Boniturtermin stand eine unterschiedliche Pflanzenanzahl der Sorte und Unterlagen für die Untersuchungen zur Verfügung.

Eine mögliche Zuordnung zu Wild- oder Kulturäpfeln wurde angestrebt.

Blattform

Die Blätter der Unterlagen waren überwiegend verkehrt eiförmig, die der Sorten elliptisch (Abb. 6). Dies deckt sich mit den Angaben von REMMY und GRUBER (1993).

Eine Unterscheidung der Unterlagen der verschiedenen Bäume bezüglich dieses Merkmals war anhand der Ergebnisse nicht eindeutig möglich. Bei einem größeren Stichprobenumfang wäre eine Zuordnung zu Sorte oder Unterlage mit Hilfe des Boniturmerkmals Blattform zu realisieren.

Blattspitze

Die Verschiedenheit oder Gleichheit der Unterlagen der Bäume war mit Hilfe dieses Merkmals anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht festzustellen (Abb. 7). Eine Zuordnung zu Sorte oder Unterlage war möglich. Die Blätter der Sorte zeigten überwiegend spitze

Blattenden, die der Unterlagen zu hohen Prozentsätzen zusätzlich zugespitzte Blattenden. Dies deckt sich mit den Angaben von BÜTTNER (1998). Er beschreibt eine seitlich ausgelenkte Spitze als wildapfeltypisch. Die Blätter von Sorten zeigen dagegen gerade Spitzen.

Blattrand

Die Eignung des Merkmales Blattrand für die Abgrenzung der Unterlagen zur Sorte ist anhand der gewonnenen Ergebnisse bei genügend großem Stichprobenumfang zu empfehlen. Eine Unterscheidung der Unterlagen anhand dieses Merkmals war nicht möglich. Die Blattränder der Sorten waren ausschließlich doppelt gesägt. Die Blätter der Unterlagen wiesen unterschiedliche Blattränder auf. Sie wurden keiner Boniturstufe eindeutig zugeordnet (Abb. 8). WAGNER (1996) hält diese Merkmal für fragwürdig, da in der Literatur widersprüchliche Aussagen bezüglich der Ausprägung zu finden sind.

Drüsen am Blattrand

Die Blätter der Unterlagen zeigten, im Vergleich zu denen der Sorte einen stärkeren prozentualen Anteil mit Drüsen am Blattrand (Abb. A 7.1). Eine Unterscheidung zwischen den Unterlagen war nicht eindeutig möglich.

FITSCHEN (1990) empfiehlt dieses Merkmal zur Beschreibung von Arten. In der zur Verfügung stehenden Literatur wird es für die Zuordnung zu Wild- oder Kulturformen des Apfels nicht aufgeführt. Die Versuchsergebnisse lassen eine Eignung bezüglich dieser Zuordnung anzweifeln.

Behaarung

Die Eignung dieses Merkmals zur Unterscheidung von Unterlage und Sorte sowie der Unterlagen untereinander ist fraglich. Die Ergebnisse zeigten, daß die Blätter der Sorte eine mittlere Behaarung aufwiesen, während die der Unterlagen unterschiedlichen Behaarungsstufen zugeordnet wurden (Abb. A 7.2). Nach REMMY und GRUBER (1993) sind die Blätter der Wildäpfel wenig bis gar nicht behaart. Im Verlauf der Vegetationsperiode erfolgt eine Verkahlung. Die Blätter der Sorten sind mittel bis stark behaart und verkahlen nur in geringem Umfang.

Die Abgrenzung zwischen Wild- und Kulturform hängt entscheidend mit der Behaarung von Blüten, Blättern und Zweigen zusammen. Da sich die Behaarung während der Vegetationsperiode verändert, ist dieses Merkmal schwer zu bewerten. Eine Beobachtung über die gesamte Vegetationsperiode ist notwendig, um den Verlauf der Verkahlung zu beobachten. Zudem sind die Behaarungsmerkmale von Blüten konstanter, da sie nur über einen kurzen Zeitraum

ermittelbar sind (REMMY und GRUBER 1993). Da die Bonitur an nur einem Termin und nur an den Blättern stattgefunden hat, sind die Ergebnisse bezüglich dieses Merkmals nicht aussagekräftig.

Nebenblätter

Nebenblätter waren sowohl bei den Unterlagen als auch bei den Sorten zu finden. Die prozentualen Anteile waren unterschiedlich (Abb. A 7.3). Mit Hilfe des Boniturmerkmals 'Nebenblätter' war keine eindeutige Unterscheidung zwischen Sorte und Unterlagen und den Unterlagen untereinander möglich. Die Nebenblätter wurden in die Bonitur einbezogen, da zunächst vermutet wurde, daß zwischen Unterlagen und Sorten ein Unterschied bezüglich des Auftretens dieses Merkmales bestehen würde. Die Ergebnisse der Bonituren konnten dies nicht bestätigen.

Die Beurteilung von morphologischen Merkmalen anhand eines Boniturschemata sind subjektiv und abhängig vom Zeitpunkt der Beurteilung (O'SVATH und GLEIDEL 1975). Eine Entscheidung, ob die beobachteten Unterlagen sich voneinander und von der Sorte unterscheiden, ist daher mit Fehlern behaftet. Zudem war es nicht möglich, mit Hilfe aller einbezogener Merkmale definierte Aussagen über diese Unterschiede zu machen. Für weitere Auswertungen bezüglich dieser Fragestellung wurden die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen herangezogen.

Die Größe des Stichprobenumfangs hängt von der Art des beobachteten Merkmals, der biologischen Variabilität des beobachteten Merkmals und der gewählten Skala (Nominal-, Ordinal-, Intervall- oder Verhältnisskala) ab. Die Entscheidung für den geeigneten Stichprobenumfang ist ein wesentlicher Schritt bei der Versuchsplanung (SCHICKE und O'SVATH 1977).

In den eigenen Versuchen stand eine unterschiedliche Anzahl an Regeneraten je Klon mit definiertem Blattmaterial für die Bonituren zur Verfügung. Aus diesem Grund waren die Stichprobenumfänge der einzelnen Klone nicht einheitlich. Ebenso standen keine Varianzschätzwerte aus vorherigen Versuchen zur Verfügung, die nach KÖHLER et al. (1992) eine Berechnung der geeigneten Stichprobengröße ermöglicht hätten. Eine statistische Verrechnung mit Signifikanzangabe erfolgte nicht, da für die Klone 53 und 58 nur fünf bzw. drei Pflanzen in die Bonituren einbezogen werden konnten. Das der Stichprobenumfang vermutlich zu gering war, zeigt auch die Verteilung der Boniturklassen der einbezogenen Sorten bezüglich der Merkmale Blattform und Blattspitze. Trotzdem die Sorten aller Bäume als genetisch identisch eingestuft wurden (Kapitel 5.4.2) unterschieden sie sich bis zu 20 % bezüglich der beobachteten Parameter. Durch eine Erhöhung des Stichprobenumfangs würden sich diese Schwankungen aufheben. Zudem würde hierdurch außerdem der unbekannte Fehler 2. Art (β -Fehler) erheblich verkleinert (KÖHLER et al. 1992).

Die Zuordnung zu Wild- oder Kulturformen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Der Umfang der Bonituren war zu gering. Wildarten standen für einen Vergleich nicht zur Verfü-

gung. In der zur Verfügung stehenden Literatur werden die wichtigsten Unterscheidungskriterien für Wildarten und Kulturformen beschrieben (REMMY und GRUBER 1993, WAGNER 1996, BÜTTNER 1997). In seinen Arbeiten stellte KRUMBHOLZ (1939) die Eignung der Apfelblüte zur Sortenbestimmung heraus. Blüten und Früchte bilden, neben den Blättern, nach BÜTTNER (1997) die Grundlage für eine Zuordnung zu Wildtypen oder Kultursorten anhand morphologischer Merkmale. Die aufgeführten Merkmale erlauben nur die Abgrenzung klarer Kultursorten von sehr ursprünglichen Wildäpfeln (REMMY und GRUBER 1993). Durch die starke Hybridisierung von Wild- und Kulturformen treten dabei Schwierigkeiten auf. Die Hybriden zeigen Merkmale in abgeschwächter Form. Das genaue Ansprechen der Merkmale und die exakte Zuordnung zu Wild- oder Kulturform erfordert eine intensive Einarbeitung (BÜTTNER 1997). Zudem besteht eine starke Variabilität innerhalb der Wildarten (REMMY und GRUBER 1993).

Zur sicheren taxonomischen Zuordnung werden von REMMY und GRUBER (1993) die Merkmale Blütenbecherdurchmesser, Blütenstieldicke, Durchmesser der Langtriebe und der Geschmack der Früchte genannt. MILDENBERGER stellte bereits 1963 nach umfangreichen Untersuchungen an Wildarten sowie an deren Kreuzungsnachkommen fest, daß sich das Kelchverhalten (haftend, abwerfend oder amphitypisch) sowie die Fruchtstengelbehaarung (Klassenbildung von kahl bis stark behaart) als taxonomisch bedeutungsvoll erwiesen. Die Fruchtform, -farbe, -höhe, -breite und die Stengelfarbe und -länge dagegen variierten sehr stark und wurden als unbrauchbare taxonomische Merkmale deklariert.

Die Regenerate der Unterlagen befanden sich zum Boniturzeitpunkt in der juvenilen Entwicklungsphase, so daß die Beurteilung generativer Merkmale nicht möglich war. Das Wachstum der Regenerate war in den ersten Jahren sehr gering, weshalb auf die Messung des Durchmessers der Langtriebe verzichtet wurde.

Molekulargenetische Untersuchungen

Die molekulargenetischen Untersuchungen ergaben, daß sich die Unterlagen der einzelnen Versuchsbäume voneinander unterscheiden. Es handelt sich um einzelne Genotypen, deren Regenerate in dieser Arbeit als Klone bezeichnet werden. Die Unterlagen sind von der jeweiligen Sorte verschieden (Abb. 9, Abb. 10). Dies bedeutet, daß sich die Sorte im Laufe der Jahre nicht freigemacht hat. Es existiert allerdings eine bestimmte Sorten-Unterlagen-Kombination je Versuchsbäum. Alle Unterlagen wurden jedoch mit ein und derselben Sorte veredelt. Diese wurde von SCHWÄRZEL (1996) pomologisch als 'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase' bestimmt.

Mit Hilfe der gewählten morphologischen Merkmale war es nicht möglich, die Unterschiede zwischen den Klonen nachzuweisen. Allerdings hoben die durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen diese Unterschiede hervor.

Die Untersuchungen wurden in den drei Versuchsjahren mit einer unterschiedlich großen Anzahl von Unterlagen und Sorten und mit drei verschiedenen DNA-Isolationsmethoden durchgeführt (Kapitel 4.3.2.1). Die gewählten Methoden eignen sich alle zur Unterscheidung von Sorten und Unterlagen und den Unterlagen untereinander (Kapitel 5.3.2.2 bis 5.3.2.4). Die Mini-Prep-Methode lieferte weniger isolierte DNA als die CTAB-Methode (Tab. 31). Letztere enthält eine zusätzliche Fällung der RNA. Die DNA liegt gereinigter vor, daher ist diese Methode der Mini-Prep-Methode vorzuziehen.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe von Markern, dem DyNA-Quant-Meßgerät und einer computergestützten Auswertung eines Tropfentestes in Kombination mit einer Gelauswertung (Kapitel 4.3.2.2). Die Auswertung mit Markern ist subjektiver als die beiden anderen genannten Verfahren und nur ergänzend hinzuzuziehen.

Die RAPD-Methode kann für eine große Anzahl von Genotypen für die molekulare Identifikation genutzt werden (DUNEMANN et al. 1997). Sie dient als Ergänzung zu taxonomischen Studien, wenn anhand phänologischer Merkmale Unterschiede nicht nachweisbar sind (DEBENER et al. 1997). Die Vorteile der RAPD-Methode liegen darin, daß geringe Mengen an DNA notwendig sind. Diese Methode wurde ausreichend entwickelt und muß für die einzelnen Arten nur geringfügig verändert werden. Der entscheidende Nachteil dieser Methode ist die Reproduzierbarkeit. Charakteristische Banden treten bei wiederholtem Einsatz nicht unbedingt wieder auf. Die Art der DNA-Isolierung, die Primerwahl und des PCR-Verfahrens wirken entscheidend auf die Wiederholbarkeit der Ergebnisse (OLIVEIRA et al. 1998).

Die DNA-Isolierung wurde in den eigenen Versuchen nach Protokollen durchgeführt, die von SCHREIBER (1996 und 1997) sowie DUNEMANN (1998) auf den Genotyp *Malus* abgestimmt wurden. Die ausgewählten Primer hatten in vorhergehenden Versuchen der genannten Autoren bei *Malus* charakteristische Banden gezeigt. Die PCR-Verfahren wurden in den einzelnen Instituten optimiert. Die Versuche wurden in drei Jahren wiederholt, wobei unterschiedliche Primer zum Einsatz kamen. Durch den Wechsel des Institutes von Dresden nach Ahrensburg war die Auswahl der zur Verfügung stehenden Primer unterschiedlich. Es wurden insgesamt 31 Primer getestet, von denen 28 polymorphe Banden ergaben. Bezüglich der Unterscheidbarkeit der Klone und Sorten ergaben die verschiedenen Primer gleiche Ergebnisse.

Die Clusteranalyse lieferte ein Dendrogramm, mit dessen Hilfe die Unterschiede zwischen den Klonen sowie zwischen Sorten und Klonen verdeutlicht wurden (Abb. 10). Diese statistische Analyse bestätigte 1998 die erzielten Ergebnisse der visuellen Auswertung der Bandenmuster 1996 und 1997 (Tab. 33 und Tab. 43).

Durch die Clusteranalyse wurden die Klone zu Gruppen zusammengefaßt. Eine Gruppe bildeten die Klone 2, 53, 58, und 96. Die zweite Gruppe wurde von allen Sorten gebildet. In der dritten Gruppen wurden die Klone 55, 1, 98, 101 sowie die drei *M. sylvestris*-Herkünfte zusammengefaßt. Mit Hilfe der errechneten Koeffizienten war es möglich, den prozentualen An-

teil gleicher Banden zwischen verschiedenen Klonen festzustellen. Dies dient als Maß für die genetische Identität der verglichenen Klone.

Insgesamt wurden 18 Marker in die Clusteranalyse einbezogen. Zum Aufzeigen der Unterschiede zwischen Sorten und Unterlagen sowie zwischen den Unterlagen untereinander ist diese Zahl ausreichend (DUNEMANN 1998). Für die Erstellung von Verwandtschaftsverhältnissen wird eine Mindestanzahl von 50 Markern für die Analyse angegeben. Dies ist ebenso notwendig, um die genaue Interpretation der Koeffizienten als Maß für die genetische Gleichheit zu gewährleisten (DUNEMANN et al. 1997). Mit Hilfe eines Primers war es bei verschiedenen Apfelgenotypen möglich, acht Sortengruppen zu unterscheiden, nicht aber die Sorten untereinander (MULCAHY et al. 1993). Dies verdeutlicht, wie stark die Anzahl genutzter Primer auf die Ergebnisse einwirken kann.

Definierte Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Klone sind demnach mit Hilfe der errechneten Koeffizienten in den eigenen Versuchen nicht möglich. Weitere Primer sind einzusetzen und zusätzliche Marker sind zu finden, um verwandtschaftliche Beziehungen deutlicher interpretieren zu können.

Zur Bildung der genannten Gruppen war die durchgeführte Analyse jedoch ausreichend. Die zwei Unterlagengruppen unterscheiden sich voneinander. Sie heben sich deutlich von der Gruppe der Sorten ab. Die Klone 1, 55, 98 und 101 zeigen eine Zugehörigkeit zu *M. sylvestris*. Wie stark diese Ähnlichkeit ausgeprägt ist, müßten weiterführende Versuche zeigen. Die *M. sylvestris*-Herkünfte unterscheiden sich. Dies bestätigt die angenommene große Variabilität innerhalb von Wildarten (REMMY und GRUBER 1993). Die Herkünfte Buttstätt (3,10) und Oberwartha 5 (OW 5) scheinen näher verwandt zu sein. Dies wäre ebenfalls in weiteren Versuchen nachzuweisen.

Virustestung

Die Untersuchungen bezüglich des Virusstatus wurde 1998 für den ApMV, CLSV und SGV durchgeführt. In die Versuche wurden die Klone 1, 2, 53, 55 und 58 einbezogen. Von allen weiteren stand nicht genügend Ausgangsmaterial für Testversuche zur Verfügung. In den Trieben des Klones 53 wurde der CLSV nachgewiesen. Alle anderen Klone waren zum Untersuchungszeitpunkt (August) ohne nachweisbaren Virusbefall (Tab. 35).

Erst durch die Einführung vegetativ vermehrter Typenunterlagen (um 1900) sind Viruskrankheiten in das Kernobstsortiment gelangt (GROPE 1994). Es wird davon ausgegangen, daß alte Sorten auf virusfreien Sämlingsunterlagen veredelt wurden, da für Apfelvirosen keine Samenübertragbarkeit bekannt ist (PASSECKER 1976). Dies trifft auch auf die untersuchten Unterlagen in den eigenen Versuchen zu, da der Pflanzzeitpunkt auf das Jahr 1804 datiert werden kann.

Die Unterlagen wurden jedoch mit Hilfe verschiedener konventioneller und *In-vitro*-Verfahren regeneriert. Es ist nicht auszuschließen, daß eine Virusinfektion während der Vermehrung stattgefunden hat. Die Prüfung des Virusstatus war notwendig, um Voraussetzungen für die Einführung und Vermarktung der Klone als Unterlagen zu schaffen. Die Sprosse, die direkt aus den Wurzeln der Versuchsbäume gebildet wurden, sind nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden. Dies erscheint in folgenden Versuchen sinnvoll, um den Virusstatus der Ausgangsbäume feststellen zu können.

Die Verteilung der getesteten Viren im pflanzlichen Gewebe ist unterschiedlich (GRÜNTZIG et al. 1994). Dies wurde bei der Probenahme nicht beachtet und sollte bei der Interpretation der Ergebnisse nicht außer acht gelassen werden. Um geeignetes Material für die Virustestung zu entnehmen, wurden von FUCHS et al. (1988) Testkalender erstellt, die virus-wirt-spezifisch sind. Sie geben Auskunft, zu welchem Zeitpunkt welches Gewebe zu entnehmen ist, um gesicherte Aussagen über den Virusstatus zu erhalten. Es wird empfohlen, mehrfach über das Jahr verteilt Material zu entnehmen und zu testen. Dies ist bei weiteren Untersuchungen zu beachten.

In die Testung wurde nur ein geringer Teil der bei Apfel bekannten Viren einbezogen. Um die Klone als virusgetestet oder virusfrei in den Handel bringen zu können, sind weitere Testungen notwendig. Hierzu müssen die gewählten Verfahren auf die zu testenden Viren abgestimmt werden (FUCHS et al. 1979, SCHIMANSKI et al. 1993). Auf Schwierigkeiten bei der Virusuntersuchung durch abgeschwächte Symptome und verminderte Viruskonzentration weisen FUCHS et al. (1993) hin.

Das *in vitro* vermehrte Material der Klone kann nicht von vornherein als virusfrei bezeichnet werden. In den eigenen Versuchen erfolgte ausschließlich eine Sproßspitzenkultur. Eventuell vorhandene Viren sind mit Hilfe dieser Methode nicht zu eliminieren. Dies ist nur durch die Meristemkultur möglich (LAIMER et al. 1988b). Das *In-vitro*-Material müßte ebenfalls in folgende Untersuchungen einbezogen werden.

7 Schlußfolgerungen und Empfehlungen

Mit Hilfe der durchgeführten Verfahren ist es gelungen, die Unterlagen der ausgewählten adulten Obstbäume zu regenerieren. In der zur Verfügung stehenden Literatur wurden Regenerationsversuche mit vergleichbar altem Material nicht beschrieben. Die ausgewählten Regenerationsverfahren und die erzielten Ergebnisse bieten Anhaltspunkte für die Regeneration adulter Unterlagen anderer Spezies. Eine Anpassung der Verfahren an den jeweils zu regenerierenden Genotyp muß jedoch erfolgen.

Die regenerierten Unterlagen erweitern den Genpool an Unterlagen und bieten als genetische Ressourcen Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen.

7.1 Weiterverwendung der regenerierten Unterlagen

Die regenerierten Unterlagen stehen zur Zeit in unterschiedlicher Anzahl zur Verfügung (Abb. 11, Abb. 12, Tab. 36). Alle Klone sowie die Original-Sorten-Unterlagen-Kombinationen werden in den folgenden Jahren *in vivo* und *in vitro* (soweit vorhanden) am Fachgebiet Baumschulwesen und Vermehrungstechnologie erhalten. Soweit es möglich ist, sollen jeweils fünf Pflanzen der einzelnen Klone in der Genbank Obst in Dresden-Pillnitz zur Erhaltung aufgepflanzt werden (Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung). In beiden Fällen handelt es sich um eine *Ex-situ*-Erhaltung. Eine Weitervermehrung einiger Klone erscheint notwendig, da nicht von allen ausreichend Material für vergleichende Versuche zur Verfügung steht. Davon betroffen sind vor allem die Klone 53, 96, 98 und 101. Diese dürfen nicht verloren gehen und sollten als genetisches Potential erhalten bleiben.

Die Klone 1, 2 und 55 wurden in größerer Anzahl regeneriert. Sie haben sich durch eine gute Vermehrbarkeit und ihre Langlebigkeit am Originalstandort ausgezeichnet. Diese Klone werden auf ihre baumschulische Leistung bezüglich ihres Wuchsverhaltens, ihrer Eigenschaft als Unterlage (für verschiedene Sorten) und Mutterpflanze für Stecklingsversuche geprüft; dies alles in Abhängigkeit von der Vermehrungsherkunft. Die wiederhergestellten Sorten-Unterlagen-Kombinationen werden erhalten und sollen an verschiedene Standorte gepflanzt werden (*In-situ*-Erhaltung). Für die *In-situ*-Erhaltung on farm werden noch Kooperationspartner gesucht.

Die ausgewählten Klone werden für die Weitervermehrung in Baumschulen als Unterlage für Streuobst- und Garten-Landschaftsbau empfohlen. Bisher werden drei Sämlingsunterlagen für den Hochstammobstbau gehandelt: 'Bittenfelder', 'Grahams Jubiläumsapfel' und

‘Antonovka’. Hiervon nimmt der ‘Bittenfelder’ prozentual den größten Anteil ein. Die Aufnahme weiterer drei Unterlagen erscheint sinnvoll. Eine größere Auswahl an Unterlagen für den Streuobst- und Garten-Landschaftsbau stände zur Verfügung. Die Unterlagen werden zunächst vegetativ vermehrt und als solche in den Baumschulen angeboten. In einigen Jahren werden nach einer freien Abblüte Sämlingsunterlagen zur Verfügung stehen.

Die Arbeitsgruppe Obst des BdB hat sich positiv gegenüber der Aufnahme neuer Unterlagen in das Sortiment für Streuobstwiesen und den Garten- und Landschaftsbau geäußert. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Zertifizierung der Unterlagen (HERR 1998).

Seit dem 23.06.1998 ist eine neue „Verordnung über das Inverkehrbringen von Anbaumaterial von Gemüse, Obst und Zierpflanzen sowie zur Aufhebung der Verordnung von Viruskrankheiten im Obstbau“ (AGOZ) in Kraft getreten. Diese Verordnung ermöglicht es, Unterlagen und Sorten ohne vorhergehende Virustestung in den Verkehr zu bringen. Diese werden als CAC (Conformitas Agraria Communitas)-Material gehandelt. Dieses Standardmaterial darf keine sichtbaren Schäden und sonstige Mängel aufweisen. Art und Sorte müssen von ausreichender Echtheit und Reinheit sein (ANONYM 1998a).

Laut BdB hat dieses Material eine mindere Qualität und wäre unter der bisherigen Virus-Verordnung-Obst (VVO) nur mit einer Ausnahmegenehmigung produziert worden. Durch das Inverkehrbringen von CAC-Material besteht die Gefahr der Verbreitung und Wiedereinschleppung von Virose- und anderen Schaderregern. Die Pflanzen- und Fruchtqualität kann entscheidend durch virusverseuchtes Material beeinflusst werden. Es ist möglich, daß CAC-Material zu nachhaltiger Qualitätsminderung führt (ANONYM 1998b).

Für die ausgewählten Unterlagen wird trotz dieser Einwände zunächst das Vermehren und Handeln als CAC-Material vorgeschlagen. Auf diese Art und Weise ist es möglich, den Markt für die Klone in naher Zukunft zu testen. Nebenher sollte die Zertifizierung angestrebt werden. Ist die Akzeptanz und die Nachfrage für die neuen Unterlagen befriedigend, so kann nach einer Virustestung und eventuell notwendigen Bereinigung in ca. 5 Jahren zertifiziertes Material angeboten werden. Dies würde das geforderte Qualitätsniveau erhalten und der Verbreitung von Virose entgegenwirken. Versuche von GROPE (1994) zum Virusstatus alter Kernobstbäume (zwischen 60 und 250 Jahre) haben den Verdacht erhärtet, daß Viruskrankheiten erst nach der Einführung vegetativ vermehrter Typenunterlagen im Kernobstsortiment auftraten. Dies geschah fast ein Jahrhundert (um 1900) nach der Pflanzung der Versuchsbäume. Da bisher bei Apfelvirose keine Samen- und Pollenübertragbarkeit nachgewiesen wurde (GROPE 1994), kann man davon ausgehen, daß die alten Apfelbäume (in diesem Falle aus der Pflanzung von 1804) auf virusfreien Sämlingsunterlagen stehen. Eine mögliche Virusinfektion während der Regenerationsversuche ist nicht auszuschließen. Die Virustestung der Klone, die in den Baumschulen weitervermehrt und gehandelt werden sollen ist daher unbedingt anzustreben.

Es besteht die Möglichkeit, die Klone in den nächsten Jahren zur Blüte zu bringen. Dies würde einerseits morphologische Bonituren anhand der Blütenmerkmale ermöglichen und eine taxonomische Zuordnung zu Wildtypen oder Kultursorten eventuell erleichtern. Andererseits würde mit Hilfe einer isolierten freien Abblüte untereinander ein Genpool entstehen, der ein Teil des damaligen Unterlagensortiments widerspiegeln würde. Hierdurch entstünde zudem eine Variabilität, die erneute Selektionsarbeiten in der Unterlagenzüchtung ermöglichen würde. Die Nachkommen ständen als virusfreie Unterlagen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

7.2 Vorschläge für ergänzende Untersuchungen

Die Ergebnisse der Versuche 1996 bis 1998 haben zu Vorschlägen für ergänzende Untersuchungen angeregt.

Die ausgewählten Klone sollten auf ihre baumschulische Leistung geprüft werden. Bei ausreichend zur Verfügung stehendem Material sind Versuche bezüglich der Verträglichkeit mit Sorten, die in Streuobstwiesen und für die Nutzung in der freien Landschaft gängig sind, anzustreben.

Um definiertes Ausgangsmaterial für die Versuche zur Verfügung zu haben, wäre es notwendig, das Alter der **Wurzelschnittlinge** zu bestimmen. Dazu könnten histologische Untersuchungen herangezogen werden. Eine Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit vom Alter könnte ermittelt werden. Die Altersbestimmung würde es ermöglichen, eine eventuell bestehende Korrelation zum Durchmesser der Wurzelschnittlinge aufzuzeigen. Durch die Erhöhung der Stichprobenumfänge wäre es möglich, eine Abhängigkeit der Regenerationsfähigkeit der Schnittlinge bezüglich der Anordnung im Gesamtwurzelsystem zu untersuchen.

Die Anzahl der horizontal gesteckten Wurzelschnittlinge sollte erhöht werden. Hierdurch stünde mehr Ausgangsmaterial für die Etablierungsversuche *in vitro* zur Verfügung. Diese Versuche könnten dann optimaler auf den jeweiligen Klon abgestimmt werden.

Bei **Veredlungen** sollte der Einfluß der Unterlagen auf die Sorte und die Standfestigkeit der Bäume in den folgenden Jahren beobachtet werden; dies alles in Abhängigkeit von der Vermehrungsherkunft. Besonders wichtig erscheint der Vergleich zwischen konventionell und *in vitro* vermehrten Unterlagen. Sind hier keine Unterschiede nachzuweisen, so ist die *In-vitro*-Vermehrung auf Grund der möglichen Massenproduktion in kurzer Zeit vorzuziehen.

In der **Stecklingsvermehrung** würde eine größere Anzahl an Mutterpflanzen Steckterminversuche je Klon ermöglichen. Die Bewurzelungsprozente könnten auf diese Art und Weise erhöht werden. Ein ausgedehnterer Vergleich der besseren Eignung *in vitro* vermehrter und kon-

ventionell vermehrter Mutterpflanzen erscheint sinnvoll. Die Beobachtung über mehrere Jahre würde zeigen, ob sich der Effekt der besseren Bewurzelbarkeit von Stecklingen, die von *in vitro* vermehrten Mutterpflanzen gewonnen wurden, verliert oder erhalten bleibt. Für die Weiterverwendung stecklingsvermehrter Unterlagen ist es wichtig, die Überwinterung der einzelnen Klone zu optimieren.

Durch Medienversuche *in vitro* wäre es möglich, die Vermehrungsraten zu erhöhen. Zudem scheint die Medienzusammensetzung für einige Klone (58) noch nicht optimal zu sein. Bezüglich einiger Klone ist es ebenfalls notwendig, die Akklimatisation zu optimieren.

In die **morphologischen Bonituren** sollten Sämlinge von Unterlagen, Wildarten und Kultursorten vergleichbaren Alters einbezogen werden. Der Vergleich des juvenilen Charakters und eine taxonomische Zuordnung würde dadurch erleichtert werden. Ebenso sollten die Regenerate über einen Zeitraum von mehreren Jahren bonitiert werden. Die Veränderung der juvenilen Merkmale kann auf diese Weise erfaßt werden.

In die **molekulargenetischen Untersuchungen** sind eine größere Anzahl Primer einzubeziehen. Hierdurch wird die Zahl möglicher Marker erhöht. Dies ist die Voraussetzung für eine genauere Beschreibung der Verwandtschaftsverhältnisse der Klone untereinander. Wenn möglich sollte das Sortenspektrum der Zeit, in der die Versuchsbäume angepflanzt wurden, erfaßt werden. Ein Vergleich der DNA der damals verbreiteten Sorten und der Klone würde eventuelle verwandtschaftliche Beziehungen aufdecken. Die DNA bekannter Wildarten sollte in die Untersuchungen einbezogen werden. Die Ergebnisse würden zeigen, ob die Regenerate eher Wildtyp- oder Sortencharakter zeigen.

Eine effiziente Methode zur Bestimmung des **Ploidiegrad** verschiedener Gewebe ist die Flow Cytometrie, bei der der DNA-Gehalt von Interphasekernen photometrisch gemessen wird. Die Darstellung der Ploidiestufen erfolgt mit Hilfe von Histogrammen. Der Vergleich zu einem Standard mit bekanntem Chromosomensatz ist Voraussetzung für die Interpretation der Ergebnisse. Die Flow Cytometrie ist in bezug auf die Einfachheit, die Genauigkeit und die Kosten eine ernst zu nehmende Alternative für die konventionelle Chromosomenzählung (DE LAAT et al. 1987). Mit diesen Versuchen wurde 1998 am Institut für Biochemie der Universität Potsdam begonnen. Einbezogen wurden die Klone 1, 2, 53, 55, 58 und 101. Als Standard wurde der Klarapfel ($2n = 2x = 34$; PETZOLD 1982) gewählt. Die Untersuchungen wurden im August durchgeführt. Ausgangsmaterial waren Blätter, die sich noch im Wachstum befanden. Der ideale Termin liegt mitten in der Wachstumsperiode. Die bisher erzielten Ergebnisse benötigen daher zwingend einer Wiederholung (BAUMANN 1998). Aus diesem Grund werden sie in dieser Arbeit nicht dargestellt. Des weiteren wurden nicht alle Klone in die Untersuchungen einbezogen. Dies ist in folgenden Versuchen zu berücksichtigen.

Die Bestimmung des Ploidiegrades kann bei der Zuordnung der Klone zu Kultursorten oder Wildarten behilflich sein. Im Rahmen der freien Abblüte der Klone untereinander ist die Kenntnis der genetischen Konstitution von Vorteil.

Zur Prüfung der **Standorteignung** wären Versuche an unterschiedlichen Standorten anzustreben. Hierfür müßte genügend Versuchsmaterial zur Verfügung stehen.

Das Resistenzverhalten gegenüber **Krankheiten** spielt in der Unterlagenzüchtung eine wichtige Rolle. Besonders wichtig sind Resistenzen gegenüber Feuerbrand (*Erwinia amylovora* [Burill] Winslow et al.), Kragenfäule (*Phytophthora cactorum* [Leb. et Cohn] Schroet.), Blutlaus (*Eriosomo langigerum* Hausm.), Mehltau (*Podosphaera leucotricha* [Ell. et Ev.] Salm.), Schorf (*Venturia inaequalis* [Cooke] Aderh.) und Virosen. Die Reihenfolge spiegelt den Grad der Bedeutung in Mitteleuropa wieder (FISCHER 1996a). Die Untersuchungen der Klone bezüglich der genannten Krankheiten würde Auskunft über eventuell auftretenden Resistenzen geben. Dies könnte sich als nützlich für die Unterlagenzüchtung erweisen.

7.3 Vorgehensweise bei Versuchen zur Regeneration adulter Unterlagen

Die Versuche 1996 bis 1998 haben gezeigt, daß eine Regeneration adulter Unterlagen möglich ist. Die einzelnen Regenerationsverfahren sind unterschiedlich gut geeignet. Der Erfolg der einzelnen Verfahren ist stark vom Klon abhängig.

Zu Beginn von Versuchen zur Regeneration unbekannter adulter Unterlagen verschiedener Spezies wird empfohlen, alle beschriebenen Verfahren durchzuführen. Nach Beendigung des ersten Versuchsjahres werden sich einige Verfahren als effektiver als andere herausstellen. Diese Verfahren können im folgenden verbessert und auf den jeweiligen Klon abgestimmt werden.

Da im vorliegenden Fall die Veredlungsstelle der Versuchsbäume nicht eindeutig über der Erdoberfläche zu erkennen war, hat sich für die Regeneration der untersuchten adulten *Malus*-Unteralagen die Methode der Wurzelschnittlingsvermehrung als Voraussetzung für alle weiteren Verfahren herausgestellt. Die gebildeten Sprosse dienten als Ausgangsmaterial für die Stecklingsvermehrung und die Sproßvermehrung *in vitro*. Letztere erbrachte in einem kurzen Zeitraum eine Vielzahl von regenerierten Unterlagen. Sie war in bezug auf diesen Parameter die effektivste Methode. Beobachtungen in den nächsten Jahren werden zeigen, ob sich die konventionell vermehrten Unterlagen und die *in vitro* erzeugten in ihrem Wuchsverhalten und ihrem Einfluß auf die Sorte unterscheiden. Ist dies nicht der Fall, so ist die *In-vitro*-Vermehrung der konventionellen vorzuziehen.

Folgende Vorgehensweise zur Regeneration von Unterlagen wird vorgeschlagen, wenn die Veredlungsstelle nicht über der Erdoberfläche zu erkennen ist oder aus anderen Gründen alle Versuche auf den Wurzelraum beschränkt werden müssen:

- **Auswahl** geeigneter **Versuchsbäume**, wenn möglich mit definiertem Alter.
- **Freilegung** eines Teiles des **Wurzelsystems** ohne schädigende Wirkung des Versuchsbäumchen.
- **Ernte** von **Wurzelstücken** bis zu 50 cm Länge.
- **Schneiden** der Wurzeln auf **15 cm Länge** (Kennzeichnen des distalen Endes).

Alle weiteren Verfahren sind parallel durchzuführen:

Wurzelschnittlingsvermehrung

- **Stecken** der Schnittlinge im **Gewächshaus** und im **Freiland** (Grundbeet oder kalter Kasten). Wenn möglich sollten Substrat- und Steckterminversuche durchgeführt werden.
- **Vertikales**, schräges Stecken (Durchmesser der Schnittlinge bis zu 2 cm am distalen Ende) für die Erzeugung von Einzelpflanzen, **horizontales Stecken** (Durchmesser der Schnittlinge über 2 cm) für die Produktion von einer Vielzahl von Sprossen.
- **Weiterkultur** der **Einzelpflanzen** zur späteren **Beobachtung** (Wuchsverhalten, morphologische Beschreibungen, molekulargenetische Untersuchungen), Verwendung als Unterlage für **Veredlungen** und als Mutterpflanze für **Stecklingsversuche**.

Veredlungen

- Verwendung der **Wurzelstücke** als **Pfropfpartner** und **Unterlage**.
- Erstellen der gewünschten **Sorten-Unterlagen-Kombinationen**.
- Anregung des Wurzelstückes zum Wachstum; Sprosse können als Ausgangsmaterial für weitere Vermehrungsversuche genutzt werden.
- Nutzen der regenerierten Unterlagen anderer konventioneller oder *In-vitro*-Verfahren als Unterlagen.

Stecklingsvermehrung

- Ausgangsmaterial : Sprosse der Wurzelschnittlinge oder bereits regenerierter Unterlagen unterschiedlicher Vermehrungsherkunft.
- **Steckterminversuche**, Optimierung der Anzuchtbedingungen und der **Überwinterung**.

***In-vitro*-Verfahren**

- **Etablierungsversuche** für die Sprosse der Wurzelschnittlinge oder bereits konventionell regenerierter Unterlagen.
- Versuche zur **Optimierung** der **Vermehrung**, **Bewurzelung** und **Akklimatisation** der etablierten Sprosse, in Abhängigkeit vom Klon.

Bewertung der regenerierten Unterlagen

- **Morphologische Beschreibungen.**
- **Molekulargenetische Untersuchungen.**
- **Vergleich** mit bekannten **Genotypen** (Wildarten, Sorten) zur Einordnung der regenerierten Klone.
- **Virustestung.**
- **Gesundheitsstatus.**

Weiterverwendung der Regenerate

- **Erhaltung** aller regenerierten Klone.
- **Auswahl** einer geeigneten und realistischen Anzahl von Klonen.
- Auffinden von **Kooperationspartnern** für die Vermehrung der ausgewählten Klone.
- **Einführung** der Klone als neue Unterlagen in den Baumschulen.

8 Zusammenfassung

Durch den zunehmenden Verlust der genetischen Vielfalt wird die Erhaltung genetischer Ressourcen immer wichtiger. Von 1994 bis 1998 wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes in Brandenburg verstärkt die Erhaltung von Streuobstanlagen mit alten Lokalsorten unterstützt. Als Wegbegleitpflanzen kommen in diesem Gebiet zahlreiche extensiv genutzte Obstbestände vor.

Im Rahmen des Projektes wurden 1996 acht repräsentative und besonders vitale Obstgehölze der Gattung *Malus* ausgewählt. Auf Grund ihres hohen Alters (Pflanzung 1804) lassen diese Gehölze auf eine sehr gute Standortanpassung sowie auf eine außergewöhnliche Vitalität der Sorten und Unterlagen schließen. Der Versuchszeitraum war auf die Jahre 1996 bis 1998 beschränkt. Während dieser Zeit wurde ein Verfahren zur Regeneration adulter Apfelunterlagen erarbeitet. Mit Hilfe verschiedener konventioneller Verfahren (Wurzelschnittlinge, Veredlungen, Stecklingsvermehrung) und *In-vitro*-Verfahren (Wurzel-, Blattsegmente- und Sproßspitzenkultur) wurde versucht, die Unterlagen der Versuchsbäume zur Sproßbildung anzuregen und zu vermehren. Die am ausgewählten Standort vorhandenen Sorten-Unteralagen-Kombinationen wurden wieder hergestellt und sollen erhalten werden. Die regenerierten Unterlagen wurden mit Hilfe morphologischer Merkmale und molekulargenetischer Methoden bewertet. Es wird angestrebt, diese Unterlagen für den Streuobst- und Garten- und Landschaftsbau zugänglich zu machen und sie als Genpool zu erhalten.

Die Versuche 1996 bis 1998 haben gezeigt, daß eine Regeneration adulter Unterlagen möglich ist. Eine schematische Übersicht über die angewandten Verfahren sowie über die Weiterverwendung und -behandlung der regenerierten Unterlagen zeigt Abb. A 8. Die einzelnen Regenerationsverfahren sind unterschiedlich gut geeignet, wobei der Erfolg stark von der Unterlage abhängig ist. Die Regenerate werden als Klone (1, 2, 53, 55, 58, 96, 98 und 101) bezeichnet.

Da die Veredlungsstelle der Versuchsbäume 1996 bis 1998 nicht zu erkennen war, mußten alle Versuche zur Regeneration der Unterlagen auf den Wurzelraum beschränkt werden. Die Methode der Vermehrung über Wurzelschnittlinge wurde angewendet. Sie war die Voraussetzung für weitere konventionelle und *In-vitro*-Regenerationsversuche. Die Versuche wurden im Gewächshaus und im Freiland unter Folie durchgeführt. Die höchsten prozentualen Ausbeuten wurden mit Wurzelschnittlingen des Durchmessers 0,1 - 0,5 cm und 0,6 - 1,0 cm erzielt. Die Wurzelschnittlinge bildeten nach dem Abstecken mehr als einen Sproß je Schnittling aus. Die meisten Sprosse wurden im oberen Drittel der Schnittlinge gebildet. Die Wurzelschnittlinge bildeten neue Wurzeln am Schnittling und/oder am gebildeten Sproß. Ein Teil der Wurzelschnittlinge blieb im Vermehrungsbeet ohne Neuwurzelbildung.

Die Ausbeute an gelungenen Veredlungen unterschied sich je Unterlage. Veredlungen von Reisern des jeweiligen Baumes auf Wurzelstücke der jeweiligen Unterlage ergaben die ursprüngliche, am Standort vorhandene Sorten-Unterlagen-Kombination. Die Ausbeuten nach Veredlungen von Wurzelstücken auf eine Sämlingsunterlage waren sehr gering. 1998 standen Klone verschiedener Vermehrungsherkünfte für die Veredlungen in geringer Anzahl zur Verfügung. Durch Veredlungen von grünen Sprossen der Wurzelschnittlinge des Jahres 1998 auf die Unterlage M9 sollte ein früherer Übergang in die generative Phase erreicht werden. Die Veredlungen wurden für die Klone 1, 2 und 55 mit gutem Erfolg durchgeführt. Die Beurteilung des Übergangs in die generative Phase ist erst in den kommenden Jahren zu beurteilen.

Die Verletzungen der Baumwurzeln führten bei allen Unterlagen zu Wundkallus und Wurzelneubildung. Nur die Unterlage des Baumes 55 reagierte mit einer Sproßbildung.

Die Versuche zur Stecklingsvermehrbarkeit wurden für fünf Klone durchgeführt. Ausgangsmaterial waren die Sprosse der Wurzelschnittlinge und der *In-vitro*-Pflanzen (nach der Akklimatisation). Es wurden Bewurzelungsprozente zwischen 10 und 100 % erzielt. Nach der Überwinterung war ein Ausfall bis zu 40 % zu verzeichnen.

Die Regeneration der Unterlagen über Wurzelstücke *in vitro* war nicht erfolgreich. Die Versuche zur Regeneration der Unterlagen über Kallusstücke führten weder zu Kallus- noch zu Sproßwachstum.

In den Versuchsjahren 1996 bis 1998 wurden die Sprosse der Wurzelschnittlinge 1, 2, 53, 55, 58 und 96 erfolgreich *in vitro* etabliert. Die Klone unterschieden sich in bezug auf die Vermehrungsrate. Zur Optimierung der Vermehrung wurde im Versuchsjahr 1997 und 1998 ein Versuch auf drei verschiedenen Medien über fünf Subkulturen durchgeführt. Für jeden Klon wird eine Medium zur Vermehrung empfohlen.

Die Bewurzelung gelang für die Sprosse aller in die *In-vitro*-Vermehrung einbezogenen Klone, bis auf die des Klones 96. Hierfür stand bisher noch nicht ausreichend genügend Sproßmaterial zur Verfügung. Die Ergebnisse nach der *In-vivo*-Bewurzelung lagen deutlich unter denen nach der *In-vitro*-Bewurzelung. Der Akklimatisationserfolg der Sprosse lag zwischen 56 und 100 %.

Die Regeneration der Unterlagen über Blattsegmente *in vitro* führte nicht zu dem gewünschten Erfolg. Es wurde Kalluswachstum induziert, eine Sproßbildung fand jedoch nicht statt.

Mit Hilfe morphologischer Merkmale und molekulargenetischer Untersuchungen wurden die Klone bewertet. Die morphologischen Merkmale (Blattform, Blattspitze, Blattrand, Drüsen am Blattrand, Behaarung, Nebenblätter) eignen sich unterschiedlich gut zur Unterscheidung von Unterlagen und Sorten. Es war nicht möglich, die Unterlagen-Klone anhand dieser aus-

gewählten Boniturmerkmale voneinander zu unterscheiden. Molekulargenetische Methoden sind eine wertvolle Ergänzung bei taxonomischen Studien. Die genetische Analyse ergab, daß sich alle Klone voneinander unterscheiden. Es handelt sich somit um einzelne Genotypen. Alle Unterlagen sind zudem von der jeweiligen Sorte verschieden. Die Versuchsbäume haben sich im Laufe der vergangenen Zeit nicht freigemacht. Es handelt sich bei den Bäumen um Veredlungen.

In den Virustest wurden die Klone 1, 2, 53, 55 und 58 einbezogen. Mit Hilfe des ELISA-Testes wurde untersucht, ob die Klone mit dem Apfelmosaik-Virus (ApMV), dem Chlorotischen Apfelblattflecken-Virus (CLSV) und/oder dem Apfelstammfrucht-Virus (SGV) infiziert waren. Der CLSV wurde in den Trieben des Klones 53 nachgewiesen. Alle anderen Klone waren zum Untersuchungszeitpunkt virusfrei. Da diese Untersuchung nur einmalig zu einem Termin durchgeführt wurde, sind die Aussagen nicht repräsentativ. Weitere Untersuchungen sind notwendig.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit wurde schematisch ein Verfahren zur Regeneration adulter Unterlagen erstellt.

Die Klone 1, 2 und 55 werden an interessierte Baumschulen abgegeben. Sie sollen dem Garten- und Landschaftsbau zugänglich gemacht werden. Die Erhaltung aller Klone und der Sorten-Unterlagen-Kombinationen als genetische Ressourcen *ex situ*, *in situ* und *in situ on farm* ist angestrebt.

9 Literaturverzeichnis

- AI-PINK, D.; HONG-FAN, W.; YU FEN, C. (1995) : Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplast of apple (*Malus x domestica* cv. 'Sakrimson'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **40** (2): 145 - 149.
- ANONYM (1992) : Apfel (Apfel-Unterlagen). *Malus* Mill. Richtlinien zur Prüfung der Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit, UPOV, Genf.
- ANONYM (1997) : Günstig besser : Gelrite - die Alternative zu Agar. Informationen der Firma ROTH. Selbstverlag.
- ANONYM (1998a) : Verordnung über das Inverkehrbringen von Anbaumaterial von Gemüse-, Obst- und Zierpflanzen sowie der Aufhebung der Verordnung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten im Obstbau. *Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998, Teil I, Nr. 36*, ausgegeben zu Bonn am 23.06.1998.
- ANONYM (1998b) : Aus der Verbandsarbeit - Zertifizierung Obst - Zertifizierung von Obstgehölzen - neue Verordnung tritt in Kürze in Kraft. *Grün* **6**: 10 - 15.
- BAJAJ, Y.P.S. (1986) : *Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Trees I*. Springer. Berlin Heidelberg New York Tokio.
- BLOCK, R. (1993) : Maßnahmen zur Verbesserung der in vitro Kultivierbarkeit ausgewählter Genotypen der Gattung *Malus*. Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich Wilhelm-Universität zu Bonn. Dissertation.
- BONGA, J.M. (1987) : Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solution. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 2, Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (eds.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, Boston, Lancaster: 249 - 271.
- BORKOWSKA, B.; LITWINCZUK, W. (1993) : Activity of thidiazuron in in vitro shoot cultures of *Prunus* sp. and *Morus alba*. *Biologia Plantarum* **35** (1) : 63 - 67.
- BÜTTNER, R. (1997) : Erkennungsmerkmale des Wildapfels *Malus sylvestris* (L.) MILLER. Information zur floristischen Kartierung in Thüringen **13**: 12 - 13.
- BÜTTNER, R. (1998) : Artmerkmale von *Malus sylvestris* (L.). Mill., vorwiegend nach sächsischem Material zusammengestellt. Informationsmaterial aus der Genbank Obst. Dresden Pillnitz.
- BÜTTNER, R. (1999): Manuskript für MANSFELD : Kulturpflanzenverzeichnis. Neuauflage 2000.
- BÜTTNER, R.; FISCHER, M. (1995) : Erhaltung genetischer Ressourcen des Obstes. In : KLEINSCHMIT, J.; BEGEMANN, F.; HAMMER, K. (1995) : Erhaltung pflanzengenetischer Ressourcen in der Land- und Forstwirtschaft. Schriften zu Genetischen Ressourcen. Schriftenreihe des Informationszentrums für Genetische Ressourcen (IGR), Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI). Band 1.
- CLARK, J.R. (1981) : Juvenility in Plant Propagation. *International Plant Propagation Society Combined Proceedings* **31**: 449 - 453.
- CLARK, M.S. (1997) : *Plant Molecular Biology - A laboratory Manual*. Springer. Berlin Heidelberg New York Tokio.

- CHONG, C.; TAPER, C.D. (1972) : *Malus* tissue cultures. 1. Sorbitol (D-glucitol) as a carbon source for callus initiation and growth. *Canadian Journal of Botany* **50**: 1399 - 1404.
- CHONG, C.; PUA, E.C. (1985) : Carbon nutrition of Ottawa 3 apple rootstock during stages of in vitro propagation. *Journal of Horticultural Science* **60** (3): 285 - 290.
- CHRIST, J.L. (1794) : *Handbuch über die Obstbaumzucht und Obstlehre*. Hermannsche Buchhandlung. Frankfurt am Main.
- DEBENER, T.; BARTELS, C.; SPETHMANN, W. (1997) : Parentage analysis in interspecific crosses between rose species with RAPD-Markers. *Gartenbauwissenschaft* **62** (4): 180 - 184.
- DEBENER, T.; MATTIESCH, L. (1998) : Effective pairwise combination of long primers for RAPD analysis in roses. *Plant Breeding* **117**: 147 - 151.
- DE BERGH, P.C. (1991) : Acclimatization techniques of plants from in vitro. *Acta Horticulturae* **289**: 291 - 300.
- DE HAAS, P.G.; HILDEBRANDT, W. (1967): *Die Unterlagen und Baumformen des Kern- und Steinobstes*. 1. Aufl.. E. Ulmer.
- DE KLERK, G.J.; TER BRUGGE, J.T.; MARINOVA, S. (1997) : Effectiveness of IAA, IBA, NAA during adventitious root formation in vitro in *Malus* Jork 9. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **49**: 39 - 44.
- DE LAAT, A.M.M.; GÖHDE, W.; VOGELZANG, M.J.D.C. (1987) : Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry. *Plant Breeding* **99**: 303 - 307.
- DONNELLY, M. (1993) : Acclimatization strategies for micropropagated plants. In: AHUJA, M.R. (1993) (Hrsg.) : *Micropropagation in Woody Plants*. Kluwer Academic Publisher. Page: 153 - 163.
- DOYLE, J.L.; DOYLE, J.J. (1990) : Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13 - 15.
- DREW, R.A. (1988) : Rapid clonal propagation of Papaya in vitro from mature field-grown trees. *HortScience* **23** (3): 609 - 611.
- DRUART, P. (1980) : Plantlets regeneration from root callus of different *Prunus* species. *Scientia Horticulturae* **12**: 339 - 342.
- DUFOUR, M.; ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. (1986): Factors influencing in vitro callus formation and regeneration of apple cultivars. *HortScience* **21** (3): 368.
- DUNEMANN, F.; KAHNAU, R.; SCHMIDT, H. (1994) : Genetic relationship in *Malus* evaluated by RAPD 'Fingerprinting' of cultivars and wild species. *Plant Breeding* **113**: 150 - 159.
- DUNEMANN, F.; KAHNAU, R. (1997) : Genetische Fingerabdrücke zur molekularen Identifizierung und Verwandtschaftsanalyse bei Rhododendron. *Rhododendron und immer-grüne Laubgehölze. Jahrbuch 1997*. Seite 8 - 20. Deutsche Rhododendron-Gesellschaft Bremen.
- DUNSTAN, D.I. (1981) : Transplantation and post-transplantation of micropropagated tree-fruit rootstocks. *International Plant Propagation Society Combined Proceedings* **31**: 39 - 45.

- DUNSTAN, D.E.; TURNER, K.E.; LAZAROFF, W.R. (1985) : Propagation in vitro of the apple rootstock M4: effects of phytohormones on shoot quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **4**: 55 - 60.
- EDWARDS, K. (1991) : *Nucleic Acids Research* **19**: 1349.
- EDWIN, F.G.; PUTTLOCK, B.S.; GEORGE, H.J. (1987) : *Plant culture media*. Vol. 1: Formulation and uses.
- FAMIANI, F.; FERRADINI, N.; STAFFOLANI, P.; STANDARDI, A. (1994) : Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on in vitro shoot regeneration of M26 apple rootstock. *Journal of Horticultural Science* **69** (4): 679 - 685.
- FASOLO-FABBRI-MAKAVASI, F.; PREDIERI, S. (1990) : Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Horticulturae* **280**: 61 - 68.
- FELLMANN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M.A. (1987) : Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. *HortScience* **22** (6): 1197 - 1200.
- FERRADINI, N.; FAMIANI, F.; PROIETTI, P.; STANICA, F. (1996) : Influence of growth regulators and light on in vitro shoot regeneration in M26 apple rootstock. *Journal of Horticultural Science* **71** (6): 859 - 865.
- FEUCHT, W.; TREUTTER, D. (1995) : Catechin effects on growth related processes in cultivated calli of *Prunus avium*. *Gartenbauwissenschaften* **60** (1): 7 - 11.
- FLEGG, C.L.; CLARK, M.F. (1979) : The detection of apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. appl. Biol.* **91**: 61 - 65.
- FINK, S. (1980) : Anatomische Untersuchungen über das Vorkommen von Sproß- und Wurzelanlagen im Stammbereich von Laub- und Nadelbäumen. II. Adventive Anlagen. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung* **115** (9): 181 - 197.
- FISCHER, M. (1996a) : Ergebnisse der Resistenzprüfung gegenüber *Erwinia amylovora* [Burill] Winslow et al. an *Malus*- und *Pyrus*-Nachkommen im Rahmen der Unterlagenzüchtung. *Erwerbsobstbau* **38** (3): 77 - 80.
- FISCHER, M. (1996b) : Pillnitzer Supporter-Unterlagen überlegen. *Obstbau* **36** (10): 17 - 20.
- FITSCHEN, J. (1990) : *Gehölzflora mit Früchteschlüssel*. 9. Auflage. Quelle und Meyer Verlag Wiesbaden.
- FORSCHUNGSGESELLSCHAFT LANDSCHAFTSENTWICKLUNG, LANDSCHAFTSBAU (Hrsg.) (1993) : Empfehlung zur Schadstoffbestimmung für Bäume an Straßen und in der Stadt. Verfasser: Arbeitskreis „Stadtbäume“ der Ständigen Konferenz der Gartenamtsleiter beim Deutschen Städtetag, GALK. Troisdorf.
- FUCHS, E.; MERKER, D.; KEGLER, G. (1979) : Der Nachweis des Chlorotischen Blattflecken-Virus des Apfels (apple chlorotic leaf spot virus), des Stammfurchungs-Virus des Apfels (apple stem grooving virus) und des Tomatenzwergebush-Virus (tomato bushy stunt virus) mit dem ELISA-Test. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **15** (6): 421 - 424.
- FUCHS, E.; GRÜNTZIG, M.; AL KAI, B. (1988) : Der serologische Nachweis mechanisch übertragbarer Viren des Kern- und Steinobstes. *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR* **42** (10): 208 - 211.

- FUCHS, E.; OTTO, F.; GRÜNTZIG, M. (1993) : Beitrag zur Ermittlung quantitativer Resistenz bei den Virus/Wirt-Kombinationen PNRV/Sauerkirsche, PPV/Pflaume und ApMV/Apfel. *Erwerbsobstbau* **35** (3): 57 - 84.
- GREENWOOD, M.S. (1987): Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* **6** (1-2): 1 - 12.
- GRIESMEIER, J.W. (1992) : Über die Grünveredlung ganzer Reiser im Freien. *Deutsche Baumschule* **43** (9): 428.
- GROPE, L. (1994) : Erfahrungen beim Aufspüren obstbaulicher Genressourcen im Nordosten Deutschlands. *Vorträge für Pflanzenzüchtung, Gatersleben* **27**: 28 - 32.
- GRÜNTZIG, M.; FUCHS, E.; PREILSTETTER, E.; AL KAI, B.; OTTO, F. (1994) : Untersuchungen zur Verteilung mechanisch übertragbarer Viren in Bäumen des Kern- und Steinobstes. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **29**: 217 - 248.
- HACKETT; W.P. (1985) : Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Review* **7**: 109 - 146.
- HANKE, V.; ROHDE, A.; GRAFE, C. (1991) : Studies on regeneration from somatic tissue in vitro, part 1 : Adventitious shoot formation from apple leaf explants. *Gartenbauwissenschaft* **56** (5): 214 - 220.
- HANKE, V. (1994) : Plant regeneration from tissue cultures of *Malus* species: The importance of the genotype. In: SCHMIDT, H.; KELLERHALS, M. (pds.) (1994): *Progress in Temperate Fruit Breeding*. Kluwer Academic Publisher. Page: 365 - 369.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. (1997) : *Plant Propagation. Principles and Practices*. 6. Auflage. Prentice Hall. New Jersey.
- HARDENBERG, G. von (1996) : *Familienchronik*.
- HELLER, R. (1996) : Obst in der Altmark: Entstehung, Verbreitung und Verdrängung von Lokalsorten. In : BEGEMANN, F. und VÖGEL, R. (Hrsg.) (1996): *In-situ-Erhaltung pflanzen-genetischer Ressourcen in der Bundesrepublik Deutschland am natürlichen Standort und on farm*. Schriften zu Genetischen Ressourcen Band 2. Schriftenreihe des Informationszentrums für Genetische Ressourcen (IGR). Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI). Bonn.
- HENNE, S.D.L. (1776) : Anweisungen wie man eine Baumschule von Obstgehölzen im Großen anlegen und gehörig unterhalten solle. Halle.
- HERR, F. (1935) : Unterlagen und Edelsorten. *Rheinische Monatszeitschrift für Obst-, Garten- und Gemüsebau* **28** (1-3): 8.
- HICKS, G.S.; NAIR, A. (1986) : Growth and morphogenesis in short-term nodal cultures of an apple rootstock in vitro. *Canadian Journal of Botany* **64** (10): 2299 - 2304.
- HILDEBRAND, V.; HARNEY, P.M. (1988) : Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum* Bailey 'Sprinter Scarlet'. *Journal of Horticultural Science* **63**: 651 - 657.
- HILKENBÄUMER, F. (1948) : *Obstbau. Grundlagen, Anbau und Betrieb*. 2. Aufl. Verlag Paul Parey.
- HOWARD, B.H. (1988) : Techniques to enhance rooting potential before cutting selection. *Acta Horticulturae* **227**: 176 - 186.

- HUETTEMANN, C.A.; PREECE, J.E. (1993) : Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33** (2): 105 - 119.
- HUTCHINSON, J.F. (1984) : Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. *Scientia Horticulturae* **22**: 347 - 358.
- HUSUNG, K.-R. (1995) : Kultur von Baumschulpflanzen im Freiland. In : BÄRTELS, A. (Hrsg.) (1995) : *Der Baumschulbetrieb*. 4. Aufl. E. Ulmer.
- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. (1979) : Rapid in vitro rooting of apple rootstock M9. *Journal of Horticultural Science* **54** (4): 309 - 311.
- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. (1981) : Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis in vitro in the apple rootstock M9 and M26. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **105**: 11 - 20.
- JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; MALHOTRO, S.B. (1984) : Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissue of apple and cherry rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **3** (4): 333 - 341.
- JESCH, H.-H. (Hrsg.) (1996) : 10 Jahre Lehre und Forschung am Fachgebiet Vermehrungstechnologie/Baumschulwesen 1985 bis 1995. Schriftenreihe des Fachgebietes Vermehrungstechnologie/Baumschulwesen Nr. 1. Humboldt-Universität zu Berlin. Landwirtschaftlich- Gärtnerische Fakultät. Institut für Gartenbauwissenschaften. Fachgebiet Vermehrungstechnologie/Baumschulwesen.
- JESCH, H.-H. (1997) : Knackpunkt ist der Übergang ins Freiland. *TASPO Gartenbaumagazin* **6** (2): 29 - 31.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; O'FARREL, D. (1977): Propagation in vitro of M26 apple rootstock. *Journal of Horticultural Science* **52** (3): 235 - 238.
- JONES, O.P.; PONTIKIS, C.A.; HOPGOOD, M.E. (1979) : Propagation in vitro of five apple scion cultivars. *Journal of Horticultural Science* **54** (2): 155 - 158.
- JONES, O.P.; GAYNER, J.A.; WATKINS, R. (1984) : Plant regeneration from callus tissue cultures of cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*) and the apple rootstock M25 (*Malus pumila*). *Journal of Horticultural Science* **59** (4): 463 - 467.
- JONES, O.P.; HADLOW, W.C.C (1989) : Juvenile-like character of apple trees produced by grafting scions and rootstocks produced by micropropagation. *Journal of Horticultural Science* **64** (3): 395 - 401.
- JONES, O.P.; WEBSTER, Ch. (1987) : Micropropagation of fruit trees: rejuvenation in-vitro and in-vivo. *IHR Annual Report*, S. 27.
- JUNCKER, B.; FAVRE, J.M. (1989) : Clonal effects in propagation oak trees via in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **19** (3): 267 - 276.
- KEMMER, E. (1936) : Die Kernobstunterlagen. Humboldt-Universität zu Berlin. Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät. Institut für Gartenbauwissenschaften. Fachgebiet Obstbau. 4. Merkblatt. 5. Auflage. Mai 1950.
- KEMMER, E.; SCHULZ, F. (1936) : Die Bedeutung der Kernobstsämlingsunterlage als Unterlage. Teil 1: Weitere Ergebnisse der Sämlingsentwicklung diploider und triploider Apfel- und Birnensämlinge. *Landwirtschaftliches Jahrbuch* **83** (3): 297 - 319.

- KEMMER, E.; GISEVIUS, R. (1948) : Zur Frage der Würzelingsvermehrung bei Obstgehölzen. Sonderdruck. Gartenbauforschung Heft 2, Oktober. Institut für Obstbau, Universität Berlin.
- KEMMER, E. (1956) : Beobachtungen an Wurzelkörpern von Apfelgehölzen. *Der Züchter* **26**: 1 - 12.
- KESTER, D. E. (1976) : The relationship of juvenility to plant propagation. *International Plant Propagation Society Combined Proceedings* **26**: 71 - 84.
- KNAPP, E. (1995) : Diagnose und Eliminierung von Viruserkrankungen aus *In-vitro*-Obstgehölzen. Dissertation, Universität für Bodenkultur, Wien.
- KÖHLER, W.; SCHACHTEL, G.; VOLESKE, P. (1992) : Biostatistik. Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler. 2. Aufl.. Springer. Berlin Heidelberg New York Tokio.
- KÖNIGLICHE LANDES-BAUMSCHULE (1855) : Verzeichnis von in- und ausländischen Wald-, Obst- und Schmuck-Bäumen und Zier- und Obst-Sträuchern.
- KOLLER, B.; LEHMANN, A.; McDERMOTT, J.M.; GESSLER, C. (1993): Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Appl. Genet.* **85**: 901 - 904.
- KRAMER, P.J.; KOZLOWSKI, T.T. (1960) : Physiology of woody plants. Academic Press, INC.
- KRIEGHOFF, O.; HANKE, V. (1994) : Nutzung von *Malus*-Wildarten in der Züchtungsforschung: In-vitro-Vermehrung und Protoplastentechnologie. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* **27**: 308 - 321.
- KRIEKEN, W.M.; VAN DER BRETELER, H.; VISSER, M.H.M.; MAVRIDOU, D. (1993) : The role of conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. *Plant Cell Report* **12** (4): 203 - 206.
- KRUMBHOLZ, G. (1939) : Beiträge zur Morphologie der Apfelblüte. II. Über die Eignung der Blütenmerkmale zur Sortenbestimmung. *Gartenbauwissenschaften* **13** (1): 1 - 65.
- KÜHNE, U.; GENNERICH, S.; HENNIG, B.; HANKE, V. (1988) : Möglichkeiten der Verbesserung der Bewurzelung in der In-vitro-Phase bei Kern- und Steinobst. *Gartenbau* **35** (6): 180 - 182.
- KUNNEMANN, B.P.A.M. (1988) : Vegetative propagation of *Malus* by tissue culture - 2000. Annual report, Research station for nursery stock, Boskoop.
- KUNNEMANN, B.P.A.M. (1990) : Vegetative propagation of *Malus* by tissue culture - 2000. Annual report, Research station for nursery stock, Boskoop.
- KUNNEMANN, B.P.A.M. (1991) : Vegetative propagation of *Malus* by tissue culture - 2000. Annual report, Research station for nursery stock, Boskoop.
- KUNNEMANN, B.P.A.M.; ALBERS, M.R.J. (1992) : Effects of tissue culture and acclimatization conditions on the survival and growth of rooted and unrooted *Malus* und *Pyrus* micro-cuttings. *Acta Horticulturae* **314**: 147 - 154.
- LAIMER, M.; da CÂMERA MACHADO, A.; HANZER, V.; HIMMLER, G.; MATTONOVICK, D.; KATINGER, H. (1988a) : *In-vitro*-Vermehrung der alten Lokalsorte 'Graf Uhlhorn August-Kavil' (*M. domestica*). *Mitteilungen Klosterneuburg* **38**: 105 - 107.

- LAIMER, M.; da CÂMARA MACHADO, A.; HANZER, V.; WEISS, H.; MATTONOVICH, D.; HIMMLER, G.; KATINGER, H. (1988b) : *In-vitro*-Kultur zur Virusfreimachung alter Apfelsorten. Mitteilungen Klosterneuburg **38**: 247 - 249.
- LAIMER da CÂMARA MACHADO, C.M.; da CÂMARA MACHADO, A.; KALTHOFF, B.; HANZER, V.; WEISS, H.; MATTANOVICH, D.; REGNER, F.; KATINGER, H. (1991a) : *In-vitro*-Methoden zur Verbesserung von Obstgehölzen. BioEngineering **7** (4): 37 - 42.
- LAIMER da CÂMARA MACHADO, C.M.; da CÂMARA MACHADO, A.; HANZER, V.; KALTHOFF, B.; WEISS, H.; MATTANOVICH, D.; REGNER, F.; KATINGER, H. (1991b) : A new, efficient method using 8-hydroxyl-quinolonol-sulfate for initiation and establishment of tissue cultures of apple from adult material. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **27**: 155 - 160.
- LÊ, C.L: (1985) : Multiplication clonale in vitro du pommier (*M. domestica* Borkh., var. 'Gravensteiner'): Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. **17** (5): 311 - 315.
- LEPPIN, W. (1931) : Der Obst- und Gemüsebau in der Mark Brandenburg. Neumann Verlag.
- LIU, M.G.; OGIWARA, I.; HAKODA, N.; SHIMURA, I. (1994) : Effects of BA, TDZ and CPPU on formation of adventitious shoots from callus derived from apple cotyledon. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **63** (3): 505 - 514.
- LORGUS, F. (1914): Arbeiten zur Verbesserung der Wildlingsunterlagen. Deutsche Obstbauzeitung **60** (12): 252 - 253.
- LUCKE, R.; SILBEREISEN, R.; HERZBERGER, E. (1992) : Obstbäume in der Landschaft. E. Ulmer.
- LYRENE, P.M. (1981) : Juvenility and production of fast-rooting cuttings from blueberry shoot cultures. Journal of the American Society of Horticultural Science **106**: 396 - 398.
- MAC DANIELS, L.H. (1952) : Anatomical basic of so-called adventitious buds in the apple. Memoir (Cornell-University, Cornell Agricultural Experiment Station, Ithara, New York) DNAL 100-N48c-2 no. **325**: 1 - 22.
- MAURER, E. (1939) : Die Unterlagen der Obstgehölze. Paul Parey Berlin.
- MEHRA, P.N.; SACHDEVA, S. (1979) : Callus culture and organogenesis in apple *Malus pumila* cultivar 'Golden-Delicious'. Phytomorphology **29** (2-3): 310 - 324.
- MEIER-DINKEL, A. (1989) : *In-vitro*-Vermehrung von Gehölzen. Spezielle Probleme und Aussichten. baumschulpraxis **19** (12): 515 - 518.
- MEYMUND, K. (1923) : Die Unterlagen unserer Baumschulen. Gartenwelt **27** (2): 10 - 15.
- MILDENBERGER; G. (1963) : Studien zur Taxonomie der Gattung *Malus*. I. Morphologisch-genetische Untersuchungen. Archiv für Gartenbau **11** (3): 191 - 207.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, E.; MUJER, C.V. (1987) : Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. HortScience **22** (6): 1194 - 1197.
- MONCOUSIN, C.; RIBAU, M. O'ROURUE, I.; GAVILLET, S. (1992): Effects of type of carbon-hydrate during proliferation and rooting of microcuttings of *Malus* Jork 9. Agronomy **12**: 775 - 781.

- MULCAHY, D.L.; CRESTI, M.; SANSAVINI, S.; DOUGLAS G.C.; LINSKENS, H.F.; BERGAMINI MULCAHY, G.; VIGNANI, R.; PANCALDI, M. (1993) : The use of random amplified polymorphic DNA's to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae* **54**: 89 - 96.
- MULLINS, M.G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. (1979) : Rejuvenation in vitro: Induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L.. *Ann. Bot.* **44**: 623 - 627.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum* **15**: 473 - 497.
- NEUMANN, K.H. (1995) : Pflanzliche Zell- und Gewebekultur. E. Ulmer Verlag.
- NEWTON, C.R.; GRAHAM, A. (1994) : PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford.
- NIEWKIRK van, J.P.; ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. (1986) : Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. *HortScience* **21**: 516 - 518.
- OBENDIECK, J.G.C.; LUCAS, E. (1876): Ein merkwürdiges und sonderbares Pflöpfresultat. *Pomologische Monatshefte* **23**: 68 - 69.
- OLIVEIRA, C.M.; MOTA, M. MONTE-CORVO, L.; GOULAO, L.; SILVA, D.M. (1998) : Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae* **79** (3,4): 163 - 174.
- OSBORNE, R.H. (1986) : Propagation by softwood cuttings from root pieces to reintroduce juvenility in a new dwarf rootstock (Ottawa 3). *International Plant Propagation Society Combined Proceedings* **36**: 361 - 365.
- OSTERC, G.; SPETHMANN, W. (1998) : Kirschen- und Apfelunterlagen durch Stecklinge vermehren. *Deutsche Baumschule* **38** (10): 18 - 21.
- O'SVATH, J.; GEIDEL, H. (1975) : Besonderheiten bei der biometrischen Auswertung von Pflanzenschutzversuchen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **82**: 449 - 466.
- PASSECKER, F. (1970) : Die Vermehrung der Obstgehölze und der Freilandziergehölze. Österreichischer Agrarverlag. 2. Aufl.. Wien.
- PASSECKER, F. (1973) : Verjüngung von Klonen durch Adventivsprosse. *Die Bodenkultur* **24**: 132 - 140.
- PASSECKER, F. (1976) : Klon-Abbau und Klon-Verjüngung des Lochapfels. *Erwerbsobstbau* **18** (4) : 55 - 57.
- PASSECKER, F. (1977) : Theorie der ontogenetischen Evolution und Alterung holziger Gewächse. *Die Bodenkultur* **28**: 277 - 294.
- PAWLICKI, N.; WELANDER, M. (1995) : Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science* **106** (2): 167 - 176.
- PETZOLD, H. (1982) : Apfelsorten. Neumann Verlag Leipzig Radebeul. 2. Aufl..
- PIERIK, R.L.M. (1987) : In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dodrecht Boston Lancaster.
- PIERIK, R.L.M. (1990) : Rejuvenation and micropropagation. *Process in Plant Cellular and Molekular Biology. Proc. VIIth. Intern. Congr. on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam*: 91 - 101.

- PLIETZSCH, A. (1996) : Nutzung *in vitro* vermehrter Mutterpflanzen für konventionelle Vermehrungsverfahren. In: BÄRTELS, A. : Gehölzvermehrung. 4. Aufl.. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart. Seite 199 - 209.
- PLIETZSCH, A. (1997) : Bewurzelte Stecklinge günstig überwintern. Deutsche Baumschule **37** (9): 474 - 476.
- PREIL, W.; ENGEHARDT, M (1977) : Meristem culture of azaleas (*Rhododendron simsii*). Acta Horticulturae **78**: 203 - 207.
- PROCHOROVA, T.B.; TJURINA, M.M.; POLIKARPOVA, F.J. (1974) : Untersuchungen des Wasserhaushaltes von Apfelklonunterlagen bei der Stecklingsvermehrung. In: BÄRTELS, A.: Gehölzvermehrung. 4. Aufl.. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart.
- REMMY, K.; GRUBER, F. (1993) : Untersuchungen zur Verbreitung und Morphologie des Wild-Apfels (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft **81**: 71 - 94.
- REYNOLDS, J.F. (1987): Chemical regulation in tissue culture: an overview. HortScience **22** (6): 1192 - 1194.
- RICHTER, J.; AUGUSTIN, W.; KLEINHEMPEL, H. (1977) : Nachweis des Kartoffel-X-Virus mit Hilfe des ELISA-Testes. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz **13**: 289 - 292.
- RICHTER, J.; KLEINHEMPEL, H.; DÖRING, U.; AUGUSTIN, W. (1979): Zur Empfindlichkeit des Nachweises von Pflanzenviren mit einer Mikrovariante des „enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)“ bei Verwendung von PVC-Tiefziehblister als Träger. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz **15**: 361 - 366.
- RIEBESEL, G. (1935) : Vegetative Vermehrung von Obstgehölzen. Der Züchter **7** (6): 156 - 159.
- RIFFAUD, J.L.; CORNU, D. (1981) : Utilisation de la culture *in vitro* pour multiplication de meristem adult (*P. avium*) sélectionnés en forêt. Agronomy **1**: 633 - 640.
- ROBINSON, J.C. (1975): The regeneration of plants from root cuttings with special reference to apple. Horticultural Abstracts **45** (6): 305 - 315.
- ROBINSON, J.C.; SCHWAB, W.W. (1977a) : Studies on the regeneration of apple cultivars from root cuttings I. Propagation aspects. Journal of Horticultural Science **52** (2): 205 - 220.
- ROBINSON, J.C.; SCHWAB, W.W. (1977b) : Studies on the regeneration of apple cultivars from root cuttings II. Carbohydrate and auxin relation. Journal of Horticultural Science **52** (3): 221 - 233.
- ROHDE, A. (1990) : Adventivsproßbildung an Blattsegmenten *in vitro* kultivierter Apfelsorten und -unterlagen. Humboldt-Universität zu Berlin. Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät. Institut für Gartenbauwissenschaften. Fachgebiet Vermehrungstechnologie/Baumschulwesen. Diplomarbeit.
- ROHLF, F. J. (1993) : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc, version 1.70). Exeter Software, Setauket, New York.
- ROSATI, P.; GAGGILOLO, D. (1987) : Field performance of micropropagated peach rootstocks and scion cultivars of cherry and apple. Acta Horticulturae **212**: 379 - 390.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) : Molecular Cloning - A laboratory. Manual. 1.-3.- Edition. Cold Spring Habor Laboratory Press.
- SANKHLA, D.; DAVIS, T.D.; DANKHLA, N. (1994) : Thidiazuron-induced in vitro shoot formation from roots of intact seedlings of *Albizia julibrissin*. *Plant Growth Regulation* **14** (3): 267 - 272.
- SCHERER, P.A.; MÜLLER, E.; LIPPERT, H.; WOLFF, G. (1992) : Multielement analysis of agar and gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellum gum gelrite. *Acta Horticulturae* **292**: 35 - 38.
- SCHICKE, P.; O'SVATH, J. (1977) : Verrechnungen von Mehrklassen-Befallsbonitierungen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **84** (1): 1 - 17.
- SCHILLER, J.C. (1795) : Die Baumzucht im Grossen. Aus zwanzigjährigen Erfahrungen im kleinen in Rücksicht auf ihre Behandlung, Kosten, Nutzen und Ertrag beurtheilt. Herausgeber STOLLE, G.. E. Ulmer Stuttgart. 1993.
- SCHIMANSKI, H.-H.; GRÜNTZIG, M.; FUCHS, E. (1993) : Comparative experiments for detecting in apple chlorotic leaf spot virus cultivars and wild apple varieties by means of biological and serological methods. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **28**: 109 - 114.
- SCHMIDT, H. (1986) : Wege zur Verkürzung der juvenilen Periode bei Äpfeln. *Erwerbsobstbau* **28** (1): 6 - 7.
- SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. (1998) : Agar as a gelling agent: differential biological effects in vitro. *Scientia Horticulturae* **77** (1,2): 109 - 116.
- SCHULZ, F. (1936) : Stand der Unterlagenforschung im Obstbau. *Forschungsdienst* 1. Sonderdruck. Humboldt-Universität zu Berlin. Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät. Institut für Gartenbauwissenschaften. Fachgebiet Obstbau.
- SCHWÄRZEL, H.; SCHWÄRZEL, M. (1996) : Sicherung obstgenetischer Ressourcen im Land Brandenburg unter Berücksichtigung von Obstbau, Landespflege und Landschaftsökologie. In : BEGEMANN, F. und VÖGEL, R. (Hrsg.) (1996): *In-situ-Erhaltung pflanzengenetischer Ressourcen in der Bundesrepublik Deutschland am natürlichen Standort und on farm*. Schriften zu Genetischen Ressourcen. Schriftenreihe des Informationszentrums für Genetische Ressourcen (IGR). Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI). Band 2. Bonn.
- SEELIGER, I. (1956) : Über die Kultur isolierter Wurzeln der Robinie. *Flora* **144** (1): 47 - 83.
- SEIFFERT, G.J.; KANZLER, P.; CAMARA-MACHADO, P. (1995) : Rhizogenesis in stem discs of *Malus pumila* rootstock M 9 'Jork': I. Hormonal and environmental effects on root induction and callus formation. *Plant Cell Report* **14** (11): 679 - 683.
- SEINGRE, D.; O'ROUKE, J.; GAVILLET, S.; MONCOUSIN, C. (1991) : Influence of gelling agent and carbon source on in vitro proliferation rate of apple rootstock EM IX. *Acta Horticulturae* **289**: 151 - 155.
- SHAW, J. K. (1919): The propagation of apple trees on their own roots. *Massachus. Stat. Bull.* **25**: 190.

- SINGHA, S. (1989) : Crabapple (*Malus* ssp.). In : BAJAJ, Y.P.S. (1989) : Biotechnologie in Agriculture and Forestry 5. Trees III : 30 - 41. Springer. Berlin Heidelberg New York Tokio.
- SON, S.H.; HALL, R.B. (1990) : Multiple shoot regeneration from root organ cultures of *Populus alba* x *Populus grandidentata*. Plant Cell Tissue and Organ Culture **20**: 53 - 57.
- SPÄTH, L. (1930) : Späth Buch 1920 - 1930. Berlin-Baumschulenweg.
- SPETHMANN, W. (1982) : Stecklingsvermehrung von Laubbaumarten. Einfluß von Erntetermin, Substrat und Wuchsstoff. Deutscher Gartenbau **2**: 42 - 48.
- SPETHMANN, W. (1985) : Propagation of *Prunus avium* by summer and winter cuttings and survival after different storage treatments. Acta Horticulturae **169**: 353 - 363.
- SPETHMANN, W. (1997) : Methoden der Gehölzvermehrung. Autovegetative Gehölzvermehrung. In: KRÜSSMANN, G. : Die Baumschule. Paul Parey. Seite 382 - 449.
- SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G. (1981) : Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. Journal of Horticultural Science **56**: 71 - 76.
- SRISKANDARAJAH, S.; SKIRVIN, R.M.; ABU-QAOU, H.; KORBAN, S.S. (1990) : Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars in vitro. Journal of Horticultural Science **65** (2): 113 - 121.
- SUTTER, E.G.; LUZA, J. (1993) : Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* M26 shoots growth in vitro. International Journal of Plant Science **154** (1): 59 - 67.
- SWARTZ, H.J.; BORS, R.; FOUAD, M.; NAESS, S.K. (1990) : The effect of in vitro pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **21** (2): 179 - 184.
- THEILER-HEDTRICH, C.; THEILER-HEDTRICH, R. (1990) : Influence of TDZ and BAP on adventitious shoot regeneration from apple leaves. Acta Horticulturae **280**: 195 - 199.
- TINGEY, S.V.; DEL TUFO, J.P. (1993) : Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiol. **101**: 349 - 352.
- TREUTTER, D. (1995) : Synthese, Metabolismus und Wirkung phenolischer Verbindungen in Kalluskulturen. Erwerbsobstbau **37** (1): 6 - 12.
- TURNER, S.R.; SINGHA, S. (1990) : Vitrication of crabapple, pear and geum on gellan gumsolidified culture medium. HortScience **25** (12): 1648 - 1650.
- WAGNER, I. (1996) : Zusammenstellung morphologischer Merkmale und ihrer Ausprägung zur Unterscheidung von Wild- und Kulturformen des Apfel- (*Malus*) und des Birnbaumes (*Pyrus*). Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft **82**: 87 - 108.
- WALDENMAIER, S. (1991) : Die Weiterkultur *in vitro* vermehrter Gehölze in der Baumschule. baumschulpraxis **21** (6): 241 - 242.
- WALKEY, D.C. (1972) : Production of apple plantlets from axillary bud meristem. Canadian Journal of Plant Science **52**: 1085 - 1087.

- WANG, Q.C.; TANG, H.R.; QUAN, Q.; ZHOU, G.R. (1994) : Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured in vitro. *Journal of Horticultural Science* **69** (5): 833 - 839.
- WAY, R.D. (1971) : Hastening the fruiting of apple seedlings. *American Journal of Horticultural Science* **96**: 384 - 389.
- WEBER, E. (1996): Notwendigkeit der *In-situ*-Erhaltung pflanzengenetischer Ressourcen aus Sicht der Wissenschaft. In: BEGEMANN, F.; VÖGEL, R. (1996) : *In-situ*-Erhaltung pflanzengenetischer Ressourcen in der Bundesrepublik Deutschland am natürlichen Standort und *on farm*. Schriften zu Genetischen Ressourcen. Schriftenreihe des Informationszentrums für Genetische Ressourcen (IGR), Zentralstelle für Agrardokumentation und -information (ZADI). Band 2. Bonn.
- WEBSTER, C.A.; JONES, O.P. (1989) : Micropropagation of apple rootstock M 9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation in vitro. *Journal of Horticultural Science* **64** (4): 421 - 428.
- WELANDER, M. (1983) : In vitro rooting of apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and akklimatization of plantlets (*Malus pumila*). *Physiologia Plantarum* **58** (3): 231 - 238.
- WELANDER, M. (1985) : In vitro shoot and root formation in the apple cultivar Akerö. *Ann. of Botany* **55**: 249 - 261.
- WELANDER, M. (1988) : Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. *Journal of Plant Physiology* **132**: 738 - 744.
- WELANDER, M.; WELANDER, N.T.; BRACKMANN, A. (1989) : Regulation of in vitro shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon courses. *Journal of Horticultural Science* **64** (3): 361 - 366.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. (1990) : DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531 - 6535.
- YEPES, L.M.; ALDWICKLE, H.S. (1994) : Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **37** (3): 257 - 269.
- ZIMMERMANN, R.H. (1984) : Rooting apple cultivars in vitro: interaction among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **27** (3): 301 - 311.
- ZIV, M.; HALEVY, A.H. (1983) : Control of oxidative browning and in vitro propagation of *Strelitzia reginae*. *HortScience* **18**: 1085 - 1087.

Persönliche Mitteilungen

Dr. I. BAUMANN (1998)
Universität Potsdam
Institut für Biochemie,
Abteilung Botanik
Maulbeerallee 2
14 469 Potsdam

Dr. F. DUNEMANN (1998)
Bundesanstalt für Züchtungsforschung
an Kulturpflanzen
Institut für Zierpflanzenzüchtung
Bornkampsweg 31
22 926 Ahrensburg

Dr. V. HANKE (1996)
Bundesanstalt für Züchtungsforschung
an Kulturpflanzen
Institut für Obstzüchtung
Pillnitzer Platz 2
01 326 Dresden

G. HERR (1998)
Baumschule Gunther Herr GbR
Baumschulenstr. 19-25
53 340 Meckenheim

Dr. I. PINKER
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Gartenbauwissenschaften
Ergänzendes Fachgebiet
Zell- und Gewebekultur
Albrecht Thaer Weg 1
14 195 Berlin

Dr. H. SCHREIBER (1996, 1997) (t)
Bundesanstalt für Züchtungsforschung
an Kulturpflanzen
Institut für Obstzüchtung
Pillnitzer Platz 2
01 326 Dresden

H. SCHWÄRZEL (1996, 1997)
Landesanstalt für Gartenbau
Abteilung Obstbau
Versuchsstation Müncheberg
Eberswalderstr. 84
15 374 Müncheberg

Anhang

A 1 Standorte der ausgewählten Versuchsbäume

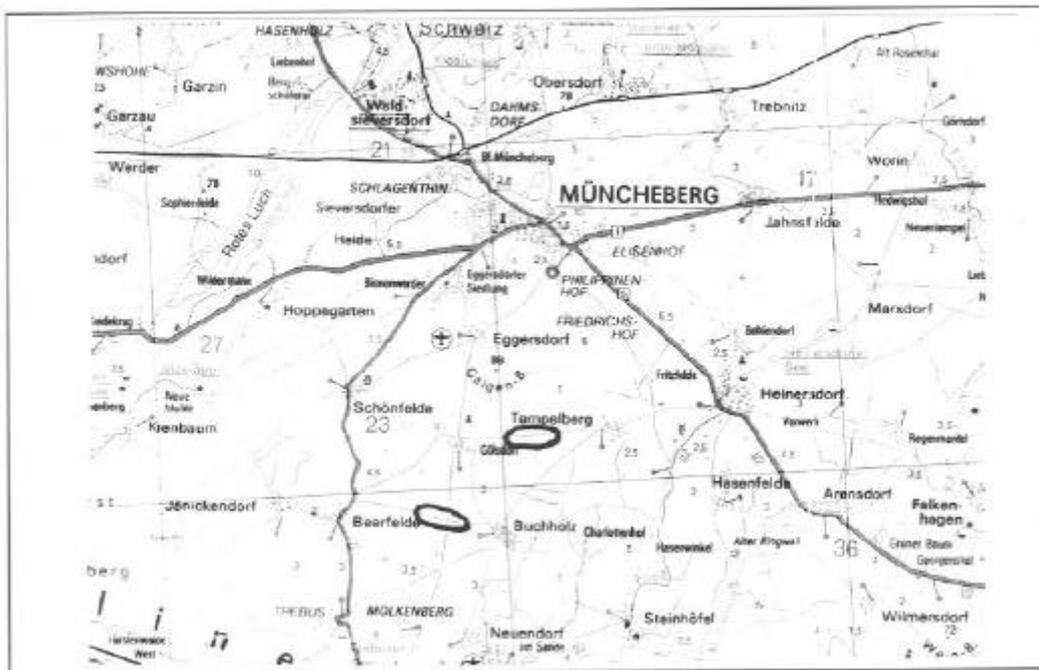


Abb. A 1: Standorte der ausgewählten Bäume für die Versuche zur Regeneration adulter *Malus*-Unterlagen

Fig. A 1: Location of experimental trees tested for regeneration of adult rootstocks

A 2 *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration

A 2.1 Varianten der Etablierungsversuche für Wurzelstücke

Tab. A 2.1: Etablierungsvarianten der Regenerationsversuche über Wurzelstücke *in vitro* (1996 und 1997)

Tab. A 2.1: Establishment treatments of root segments in vitro (1996 and 1997)

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
-	-	4 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	-	6 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	4 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	6 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	-	d	Gelrite	1996 (F, H) 1997 (F, H)
+	+	6 min	+	hormonfrei 1 Subkultur, dann TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	-	d 1 Subkultur dann h	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	-	hormonfrei	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	hormonfrei	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	hormonfrei	+ (0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	+ (0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
-	+	8 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	-	4 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

A	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
-	-	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	4 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	* (0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	h	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	* (0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
-	+	8 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
-	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,2%)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H) 1997 (F, H)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d 1 Subkultur dann h	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 2 Subkulturen, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	h	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,2%)	d	Agar	1996 (F)
-	+	8 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 2 Subkulturen, dann BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 4 Subkulturen, dann BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 6 Subkulturen, dann BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H) 1997 (F)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,2 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,4 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 2 Subkulturen, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)

A 2.2 Medienzusammensetzung

Tab. A 2.2.1: Grundzusammensetzung des verwendeten MS-Mediums¹ *in vitro* (1996 bis 1998)

Tab. A 2.2.1: Composition of the MS-Medium used in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
Makrobestandteile		
NH ₄ NO ₃	g	16,5
KNO ₃	g	19,0
CaCl ₂ x H ₂ O	g	4,4
MgSO ₄	g	1,8
KH ₂ PO ₄	g	1,7
Mikrobestandteile		
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	g	0,86
H ₃ BO ₃	g	0,62
MnSO ₄ x H ₂ O	g	2,23
KJ	g	0,083
Na ₂ MoO x H ₂ O	g	0,025
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	g	0,0025
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	g	0,0025
Eisenlösung		
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	g	7,45
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	g	5,57

¹ = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert von PINKER (1996)

Tab. A 2.2.2: Medium mit dem Zusatz von Ascorbinsäure und Aktivkohle *in vitro* (1996 bis 1998)

Tab. A 2.2.2: Medium with addition of ascorbic acid and activated carbon in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	50
MS - Mikrostammlösung	ml	10
Eisen	ml	5
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,1
Pyridoxin-HCL	ml	0,5
Nikotinsäure	ml	0,5
Glycin	ml	0,2
Ascorbinsäure	mg	100
Aktivkohle	g	2
Saccharose	g	20
Agar	mg	8
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

Tab. A 2.2.3: Mediumzusammensetzung für die Vermehrung der Sprosse der Unterlagen *in vitro* (1996 bis 1998); Zusätze der Hormone je nach Versuchsvariante

Tab. A 2.2.3: Composition of the propagation medium for the shoots of the rootstocks in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	100
MS - Mikrostrommlösung	ml	10
Eisen	ml	10
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,1
Pyridoxin-HCL	ml	0,5
Nikotinsäure	ml	0,5
Glycin	ml	0,2
Sorbitol	g	20
Agar	g	8
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

Tab. A 2.2.4: Mediumzusammensetzung für die Bewurzelung der Sprosse der Unterlagen *in vitro* (1997 und 1998)

Tab. A 2.2.4: Composition of the rooting medium for the shoots of the rootstocks in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	50
MS - Mikrostammlösung	ml	5
Eisen	ml	5
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,4
IBS	ml	3
Saccharose	g	20
Agar oder	g	8
Gelrite	g	3
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

Tab. A 2.2.5: Mediumzusammensetzung für die Regenerationsversuche über Blattsegmente *in vitro* (1997 und 1998)

Tab. A 2.2.5: Composition of the regeneration medium for the experiments by leaf segments in vitro (1997 und 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	100
MS - Mikrostammlösung	ml	10
Eisen	ml	10
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,1
Pyridoxin-HCL	ml	0,5
Nikotinsäure	ml	0,5
Glycin	ml	0,2
TDZ	ml	0,1
IBS	ml	0,1
GA ₃	ml	0,1
Saccharose	g	30
Agar	g	8
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

A 2.3 Boniturschemata der Kallusinduktion und Kallusgröße

Tab. A 2.3.1: Boniturschema zur Beurteilung der Kallusinduktion an Blattsegmenten (1996) (nach ROHDE 1990)

Tab. A 2.3.1: Scoring system to value the induction of callus at leaf segments in vitro (1996)

Boniturnote	Merkmal
1	vereinzelte Induktion
2	Induktion an mehreren Stellen, besonders an Schnittstellen
3	Induktion am Rand und der Oberseite des Blattes

Tab. A 2.3.2: Boniturschema zur Beurteilung der Kallusgröße an Blattsegmenten (1996) (nach ROHDE 1990)

Tab. A 2.3.2: Scoring system to value the size of callus at leaf segments in vitro (1996)

Boniturnote	Merkmal
1	winzig (1 mm)
2	sehr klein (1 - 4 mm)
3	klein (4 - 10 mm)
4	mittelgroß (10 - 15 mm)

A 3 Boniturschemata (vegetative Merkmale)

**Tab. A 3.1: Boniturschema,
Merkmal: Blattform
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.1: Scoring system.
Scoring sign : leaf shape*

Boniturnote	Merkmal
1	elliptisch
2	eiförmig
3	verkehrt eiförmig

**Tab. A 3.2: Boniturschema,
Merkmal: Blattspitze
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.2: Scoring system.
Scoring sign : leaf tip*

Boniturnote	Merkmal
1	spitz
2	zugespitzt
3	stumpf
4	abgerundet
5	gestutzt
6	ausgerandet
7	stachelspitzig

**Tab. A 3.3: Boniturschema,
Merkmal: Blattrand
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.3: Scoring system
Scoring sign : leaf edge*

Boniturnote	Merkmal
1	ganzrandig
2	wellig
3	gekerbt
4	gezähnt
5	gesägt
6	doppelt gesägt

**Tab. A 3.4: Boniturschema,
Merkmal: Drüsen am Blattrand
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.4: Scoring system
Scoring sign : glandular leaf edge*

Boniturnote	Merkmal
1	ja
2	nein

Tab. A 3.5: Boniturschema, Merkmal: Behaarung (REMMY 1993)

Tab. A 3.5: Scoring system. Scoring sign : leaf hairs

Boniturnote	Merkmal
0	keine Behaarung
1	<ul style="list-style-type: none">■ leichte Behaarung■ mit bloßem Auge schwer erkennbar■ lediglich an Hauptblattadern■ vor allem am Blattgrund■ Abgrenzungen der Interkostalfelder sind frei sichtbar
2	<ul style="list-style-type: none">■ mittlere Behaarung■ mit bloßem Auge stark erkennbar■ auch Behaarung in Interkostalfeldern■ Abgrenzungen der Interkostalfelder sind behaart
3	dichte wollige krause Behaarung

Tab. A 3.6: Boniturschema, Merkmal: Nebenblätter (FITSCHEN 1990; A 18)

Tab. A 3.6: Scoring system; Scoring sign : stipules

Boniturnote	Merkmal
1	ja
2	nein

A 4 Primersequenzen

Tab. A 4: In die PCR-Analyse einbezogene Primer (1996 bis 1998)

Tab. A 4: Primer used in PCR analysis (1996 to 1998)

Primer-Bezeichnung	Sequenzfolge	Versuchsjahr
260-09	5' CCT GAT GAC C 3'	1996; 1997
470-01	5' GCC CCT CTT G 3'	1996; 1997
D 13	5' GGG GTG ACG A 3'	1997
OPC 06	5' GAA CGG ACT C 3'	1996; 1997
OPC 09	5' CTC ACC GTA A 3'	1996; 1997
OPD 04	5' GTC GCC GTC A 3'	1996
OPD 13	5' GGG GTG ACG A 3'	1996; 1997
OPF 03	5' CCTGAT CAC C 3'	1996; 1997
OPL 07	5' AGG CGG GAA C 3'	1996; 1997
OPO 04	5' AAG TCC GCT C 3'	1997
OPO 07	5' CAG CAC TGA C 3'	1996; 1997
OPO 10	5' TCA GAG CGC C 3'	1996; 1997
OPO 19	5' GGT GCA CGT T 3'	1996; 1997
OPR 16	5' CTC TGC GCG T 3'	1996
OPX 01	5' CTG GGC ACG A 3'	1996; 1997
OPX 02	5' TTC CGC CAC C 3'	1996; 1997
OPX 03	5' TGG CGC AGT G 3'	1996; 1997
OPX 04	5' CCG CTA CCG A 3'	1996; 1997
29499	5' CAG GCC CTT CTG CAG AGC TG 3'	1998
29503	5' GGG TAA CGC CGT GAT CGC AG 3'	1998
29507	5' GAC CGC TTG TAG GTG ACC GT 3'	1998
29508	5' CAA ACG TCG GGT TGC GAT CC 3'	1998
29511	5' TCA GGG AGG TAA GAC CCC TC 3'	1998
29512	5' AGA TGC AGC CTC ACC ACG GT 3'	1998
29513	5' CCC GAT TCG GTG AGG CTG AG 3'	1998
29514	5' ACG CAC ACC CGG TGA CTG TG 3'	1998
29515	5' CTA CTG CCG TGG ACT GCA GA 3'	1998
29518	5' GAG TCT CAG GTT ATC GCC CC 3'	1998

Fortsetzung Tab. A 4

Primer-Bezeichnung	Sequenzfolge	Versuchsjahr
29496 + 29509	5' GGA TGC CAC TGG TGA ACG CT 3' 5' CCC AAG GTC CGG TGC GTG AA 3'	1998
29496 + 29514	5' GGA TGC CAC TGG TGA ACG CT 3' 5' ACG CAC ACC CGG TGA CTG TG 3'	1998

A5 Veredlungen

Tab. A 5.1: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen (UL) 53 und 55 über Veredlungen (1996 bis 1998)

Tab. A 5.1: Regeneration results of the rootstocks 53 and 55 by graftings (1996 to 1998)

UL	Veredlungs- unterlage	Pfropfpartner	1996			1997			1998		
			April	Oktober	%	April	Oktober	%	April	Oktober	%
53	Bittenfelder	Wurzelschnittling	20	1	5	11	0	0	8	0	
	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	8	80	4	4	100			
	Wurzelschnittling	'Golden Delicious'	10	0	0	-					
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	0	0	12	4	33,3	9	2	22,2
	Steckling (1996)	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'							1	1	1
55	Bittenfelder	Wurzelschnittling	20	8	40	6	0	0	4	2	50,0
	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	10	100	4	4	100			
	Wurzelschnittling	'Golden Delicious'	10	1	10	-					
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	3	30	5	4	80	4	3	75,0
	Steckling (1996)	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'							5	5	1
	Wurzelschnittling (1996)	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'							9	8	88,9
	In-vitro-Pflanze (Akk ¹ 1997)	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'							5	5	1
	M 9	In-vitro-Pflanze (Akk 1997)							5	5	1
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)							15		

1 = Akk = Akklimatisation

Tab. A 5.2: Ergebnisse der Regeneration der Unterlage (UL) 58 über Veredlungen (1996 bis 1998)

Tab. A 5.2: Regeneration results of the rootstocks 58 by graftings (1996 to 1998)

UL	Veredlungs- Unterlage	Pfropfpartner	1996			1997			1998		
			Anzahl April	Oktober	%	Anzahl April	Oktober	%	Anzahl April	Oktober	%
58	Bittenfelder	Wurzelschnittling	15	0	0	17	0	0	6	0	0
	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	40	8	80	4	4	100			
	Wurzelschnittling	'Golden Delicious'	10	0	0	-					
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	0	0	10	2	20	6	0	0
	Steckling (1996)	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'							2	2	100
	In-vitro-Pflanze (Akk ¹ 1997)	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'							2	2	100
	M 9	In-vitro-Pflanze (Akk 1997)							5	5	100

1 = Akk = Akklimatisation

Tab. A 5.3: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen (UL) 1, 2, 96, 98 und 101 über Veredlungen (1997 und 1998)

Tab. A 5.3: Regeneration results of the rootstocks 1, 2, 96, 98 and 101 by graftings (1996 to 1998)

UL	Veredlungs- unterlage	Pfropfpartner	1997			1998		
			Anzahl		%	Anzahl		%
			April	Oktober		April	Oktober	
1	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	1	10			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	11	0	0	6	0	0
	Wurzelschnittling	'Golden Delicious'	4	4	100			
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	11	5	45,5	10	6	60,0
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)				10	10	100
2	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	6	60			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	18	6	33,3	6	0	0
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	20	11	55,0	9	3	33,3
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)				5	5	100
96	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	10	100			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	7	0	0	6	0	0
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	9	1	11,1	5	0	0
98	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	10	100			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	10	0	0	8	0	0
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	4	0	0	11	1	9,1
101	Bittenfelder	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	1	10			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	10	0	0	9	0	0
	Wurzelschnittling	'Rotgestreifte Gelbe Schafsnase'	10	4	40	8	0	0

A 6 Verletzungen der Baumwurzeln

Tab. A 6: Wurzel- und Sproßbildung nach einer Verletzung der Wurzeln der Unterlage (UL) der Versuchsbäume am Standort (1996 und 1997)

Tab. A 6: Formation of shoots and roots after injuring the roots of the rootstocks at the origin location (1996 and 1997)

UL	Jahr	Wurzelbildung 1996, 1997	Anzahl Sprosse	
			1996	1997
53	1996	+	-	-
55		+	3	3
58		+	-	-
1	1997	+	-	-
2		+	-	-
53		+	-	-
55		+	-	-
58		+	-	-
96		+	-	-
98		+	-	-
101		+	-	-

A7 Morphologische Untersuchungen

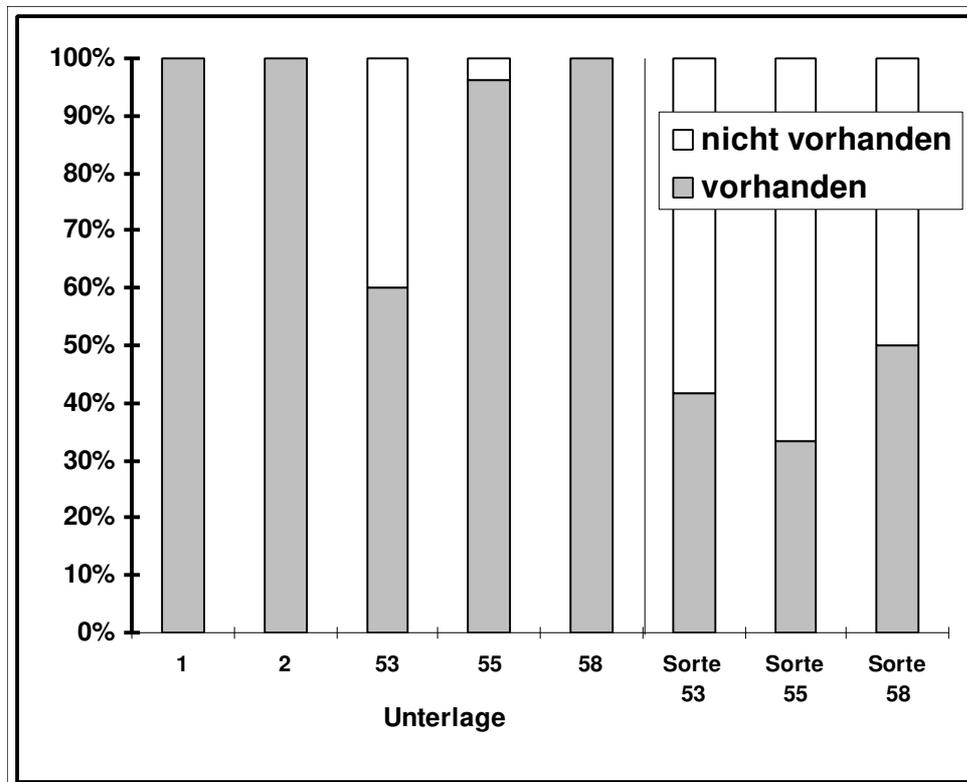
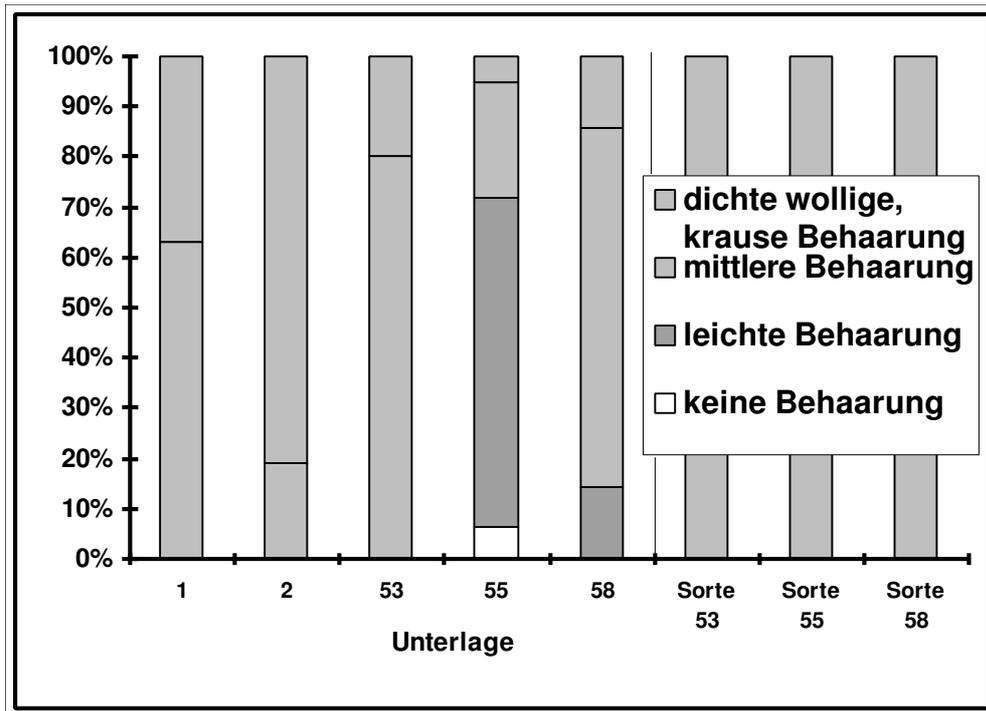


Abb. A 7.1: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58
Boniturmerkmal : Drüsen am Blattrand (1997)

Fig. A 7.1: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58
Scoring sigh:glandular leaf edge



**Abb. A 7.2: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58
Boniturmerkmal : Behaarung (1997)**

*Fig. A 7.2: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58
Scoring sigh: leaf hairs*

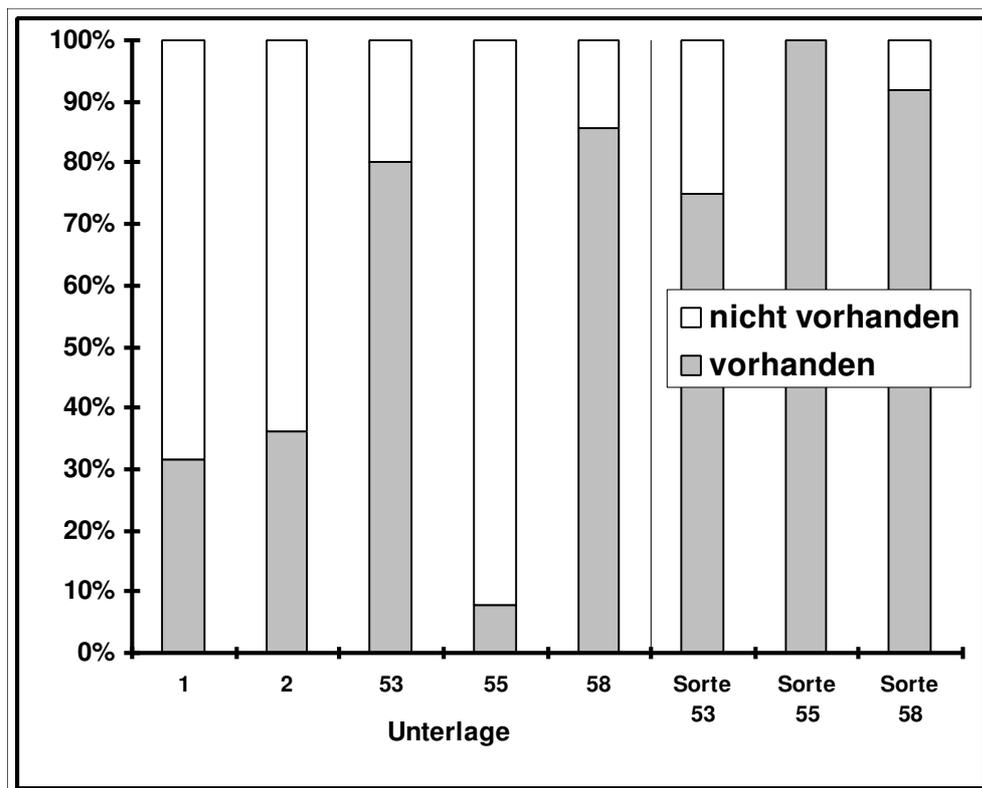


Abb. A 7.3: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58
Boniturmerkmal : Nebenblätter, 1997

Fig. A 7.3: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leaves of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58
Scoring sign: stipules

A 8 Übersicht über die angewandten Regenerationsverfahren

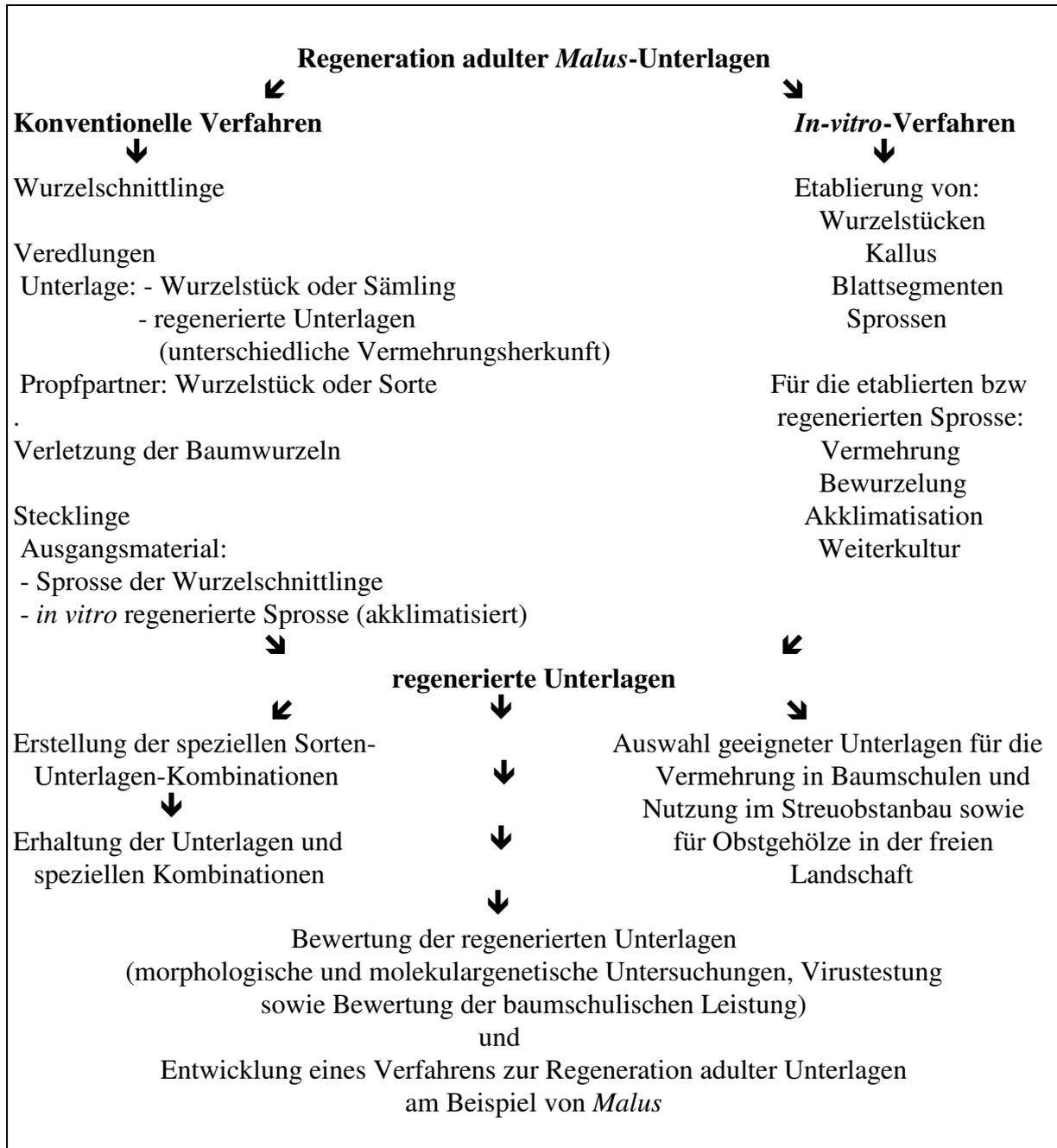


Abb. A 8: Übersicht über die angewandten Verfahren zur Regeneration adulter *Malus*-Unterlagen sowie über die Weiterverwendung und -behandlung der regenerierten Unterlagen

Fig. A 8: Procedures used for the regeneration of adult Malus-rootstocks and further treatment of the regenerated rootstocks

Anhang

A 1 Standorte der ausgewählten Versuchsbäume



Abb. A 1: Standorte der ausgewählten Bäume für die Versuche zur Regeneration adulter *Malus*-Unterlagen

Fig. A 1: Location of experimental trees tested for regeneration of adult rootstocks

A 2 *In-vitro*-Verfahren zur Regeneration

A 2.1 Varianten der Etablierungsversuche für Wurzelstücke

Tab. A 2.1: Etablierungsvarianten der Regenerationsversuche über Wurzelstücke *in vitro* (1996 und 1997)

Tab. A 2.1: *Establishment treatments of root segments in vitro (1996 and 1997)*

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
-	-	4 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	-	6 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	4 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	6 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	-	d	Gelrite	1996 (F, H) 1997 (F, H)
+	+	6 min	+	hormonfrei 1 Subkultur, dann TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	-	d 1 Subkultur dann h	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	-	hormonfrei	+(0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	hormonfrei	+(0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	hormonfrei	+(0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	+(0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	+(0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	hormonfrei	+(0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
-	+	8 min	-	hormonfrei	-	d	Agar	1996 (F)
-	-	4 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

A	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
-	-	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	4 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
-	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	* (0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	h	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	* (0,2 %)	d	Agar	1996 (F)
-	+	8 min	-	TDZ (0,1 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
-	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,2%)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H) 1997 (F, H)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d 1 Subkultur dann h	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 2 Subkulturen, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	h	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,05 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,1 %)	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	+ (0,2%)	d	Agar	1996 (F)
-	+	8 min	-	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Agar	1996 (F)
+	+	6 min	+	BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 2 Subkulturen, dann BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 4 Subkulturen, dann BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 6 Subkulturen, dann BAP (2,0 mg/l) IBS (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H) 1997 (F)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	½ MS-Makro- nährstoffe, TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,2 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,4 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l)	-	d	Gelrite	1996 (F, H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 1 Subkultur, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)

Fortsetzung der Tab. A 2.1

Spaltenbezeichnung : a = Wässern (2h), b = Alkoholbehandlung (70%, 30 sec.), c = Dauer der HgCl₂-Behandlung (0,2 %), d = 3 Tage bei 4 °C, Medium mit Aktivkohle und Ascorbinsäure.

a	b	c	d	Hormonzusätze (Grundmedium: modifiziertes MS-Medium)	Chinosol- behandlung (18 h)	Kultur im Dunkeln (d) oder im Hellen (h)	Verfesti- gungs- mittel	Ernte, Frühjahr (F), Herbst (H)
+	+	6 min	+	TDZ (0,2 mg/l) 2,4 D (0,1 mg/l) GA ₃ (0,1 mg/l) 2 Subkulturen, dann hormonfrei	-	d	Gelrite	1997 (F)

A 2.2 Medienzusammensetzung

Tab. A 2.2.1: Grundzusammensetzung des verwendeten MS-Mediums¹ *in vitro* (1996 bis 1998)

Tab. A 2.2.1: Composition of the MS-Medium used in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
Makrobestandteile		
NH ₄ NO ₃	g	16,5
KNO ₃	g	19,0
CaCl ₂ x H ₂ O	g	4,4
MgSO ₄	g	1,8
KH ₂ PO ₄	g	1,7
Mikrobestandteile		
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	g	0,86
H ₃ BO ₃	g	0,62
MnSO ₄ x H ₂ O	g	2,23
KJ	g	0,083
Na ₂ MoO x H ₂ O	g	0,025
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	g	0,0025
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	g	0,0025
Eisenlösung		
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	g	7,45
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	g	5,57

¹ = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert von PINKER (1996)

Tab. A 2.2.2: Medium mit dem Zusatz von Ascorbinsäure und Aktivkohle *in vitro* (1996 bis 1998)*Tab. A 2.2.2: Medium with addition of ascorbic acid and activated carbon in vitro (1996 to 1998)*

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	50
MS - Mikrostrommlösung	ml	10
Eisen	ml	5
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,1
Pyridoxin-HCL	ml	0,5
Nikotinsäure	ml	0,5
Glycin	ml	0,2
Ascorbinsäure	mg	100
Aktivkohle	g	2
Saccharose	g	20
Agar	mg	8
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

Tab. A 2.2.3: Mediumzusammensetzung für die Vermehrung der Sprosse der Unterlagen *in vitro* (1996 bis 1998); Zusätze der Hormone je nach Versuchsvariante

Tab. A 2.2.3: Composition of the propagation medium for the shoots of the rootstocks in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	100
MS - Mikrostammlösung	ml	10
Eisen	ml	10
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,1
Pyridoxin-HCL	ml	0,5
Nikotinsäure	ml	0,5
Glycin	ml	0,2
Sorbitol	g	20
Agar	g	8
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

Tab. A 2.2.4: Mediumzusammensetzung für die Bewurzelung der Sprosse der Unterlagen *in vitro* (1997 und 1998)

Tab. A 2.2.4: Composition of the rooting medium for the shoots of the rootstocks in vitro (1996 to 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	50
MS - Mikrostammlösung	ml	5
Eisen	ml	5
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,4
IBS	ml	3
Saccharose	g	20
Agar oder	g	8
Gelrite	g	3
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

Tab. A 2.2.5: Mediumzusammensetzung für die Regenerationsversuche über Blattsegmente *in vitro* (1997 und 1998)

Tab. A 2.2.5: Composition of the regeneration medium for the experiments by leaf segments in vitro (1997 und 1998)

Bestandteil	Einheit	Menge je Liter
MS ¹ - Makrostammlösung	ml	100
MS - Mikrostammlösung	ml	10
Eisen	ml	10
myo - Inositol	mg	100
Thiamin-HCL	ml	0,1
Pyridoxin-HCL	ml	0,5
Nikotinsäure	ml	0,5
Glycin	ml	0,2
TDZ	ml	0,1
IBS	ml	0,1
GA ₃	ml	0,1
Saccharose	g	30
Agar	g	8
pH-Wert		5.8

1 = MURASHIGE und SKOOG (1962), verändert siehe Tab. A 2.2.1.

A 2.3 Boniturschemata der Kallusinduktion und Kallusgröße

Tab. A 2.3.1: Boniturschema zur Beurteilung der Kallusinduktion an Blattsegmenten (1996) (nach ROHDE 1990)

Tab. A 2.3.1: Scoring system to value the induction of callus at leaf segments in vitro (1996)

Boniturnote	Merkmal
1	vereinzelte Induktion
2	Induktion an mehreren Stellen, besonders an Schnittstellen
3	Induktion am Rand und der Oberseite des Blattes

Tab. A 2.3.2: Boniturschema zur Beurteilung der Kallusgröße an Blattsegmenten (1996) (nach ROHDE 1990)

Tab. A 2.3.2: Scoring system to value the size of callus at leaf segments in vitro (1996)

Boniturnote	Merkmal
1	winzig (1 mm)
2	sehr klein (1 - 4 mm)
3	klein (4 - 10 mm)
4	mittelgroß (10 - 15 mm)

A 3 Boniturschemata (vegetative Merkmale)

**Tab. A 3.1: Boniturschema,
Merkmal: Blattform
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.1: Scoring system.
Scoring sign : leaf shape*

Boniturnote	Merkmal
1	elliptisch
2	eiförmig
3	verkehrt eiförmig

**Tab. A 3.2: Boniturschema,
Merkmal: Blattspitze
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.2: Scoring system.
Scoring sign : leaf tip*

Boniturnote	Merkmal
1	spitz
2	zugespitzt
3	stumpf
4	abgerundet
5	gestutzt
6	ausgerandet
7	stachelspitzig

**Tab. A 3.3: Boniturschema,
Merkmal: Blattrand
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.3: Scoring system
Scoring sign : leaf edge*

Boniturnote	Merkmal
1	ganzrandig
2	wellig
3	gekerbt
4	gezähnt
5	gesägt
6	doppelt gesägt

**Tab. A 3.4: Boniturschema,
Merkmal: Drüsen am Blattrand
(FITSCHEN 1990; A 18)**

*Tab. A 3.4: Scoring system
Scoring sign : glandular leaf edge*

Boniturnote	Merkmal
1	ja
2	nein

Tab. A 3.5: Boniturschema, Merkmal: Behaarung (REMMY 1993)

Tab. A 3.5: Scoring system. Scoring sign : leaf hairs

Boniturnote	Merkmal
0	keine Behaarung
1	<ul style="list-style-type: none"> ■ leichte Behaarung ■ mit bloßem Auge schwer erkennbar ■ lediglich an Hauptblattadern ■ vor allem am Blattgrund ■ Abgrenzungen der Interkostalfelder sind frei sichtbar
2	<ul style="list-style-type: none"> ■ mittlere Behaarung ■ mit bloßem Auge stark erkennbar ■ auch Behaarung in Interkostalfeldern ■ Abgrenzungen der Interkostalfelder sind behaart
3	dichte wollige krause Behaarung

Tab. A 3.6: Boniturschema, Merkmal: Nebenblätter (FITSCHEN 1990; A 18)

Tab. A 3.6: Scoring system; Scoring sign : stipules

Boniturnote	Merkmal
1	ja
2	nein

A 4 Primersequenzen

Tab. A 4: In die PCR-Analyse einbezogene Primer (1996 bis 1998)

Tab. A 4: Primer used in PCR analysis (1996 to 1998)

Primer-Bezeichnung	Sequenzfolge	Versuchsjahr
260-09	5' CCT GAT GAC C 3'	1996; 1997
470-01	5' GCC CCT CTT G 3'	1996; 1997
D 13	5' GGG GTG ACG A 3'	1997
OPC 06	5' GAA CGG ACT C 3'	1996; 1997
OPC 09	5' CTC ACC GTA A 3'	1996; 1997
OPD 04	5' GTC GCC GTC A 3'	1996
OPD 13	5' GGG GTG ACG A 3'	1996; 1997
OPF 03	5' CCTGAT CAC C 3'	1996; 1997
OPL 07	5' AGG CGG GAA C 3'	1996; 1997
OPO 04	5' AAG TCC GCT C 3'	1997
OPO 07	5' CAG CAC TGA C 3'	1996; 1997
OPO 10	5' TCA GAG CGC C 3'	1996; 1997
OPO 19	5' GGT GCA CGT T 3'	1996; 1997
OPR 16	5' CTC TGC GCG T 3'	1996
OPX 01	5' CTG GGC ACG A 3'	1996; 1997
OPX 02	5' TTC CGC CAC C 3'	1996; 1997
OPX 03	5' TGG CGC AGT G 3'	1996; 1997
OPX 04	5' CCG CTA CCG A 3'	1996; 1997
29499	5' CAG GCC CTT CTG CAG AGC TG 3'	1998
29503	5' GGG TAA CGC CGT GAT CGC AG 3'	1998
29507	5' GAC CGC TTG TAG GTG ACC GT 3'	1998
29508	5' CAA ACG TCG GGT TGC GAT CC 3'	1998
29511	5' TCA GGG AGG TAA GAC CCC TC 3'	1998
29512	5' AGA TGC AGC CTC ACC ACG GT 3'	1998
29513	5' CCC GAT TCG GTG AGG CTG AG 3'	1998
29514	5' ACG CAC ACC CGG TGA CTG TG 3'	1998
29515	5' CTA CTG CCG TGG ACT GCA GA 3'	1998
29518	5' GAG TCT CAG GTT ATC GCC CC 3'	1998

Fortsetzung Tab. A 4

Primer-Bezeichnung	Sequenzfolge	Versuchsjahr
29496 + 29509	5' GGA TGC CAC TGG TGA ACG CT 3' 5' CCC AAG GTC CGG TGC GTG AA 3'	1998
29496 + 29514	5' GGA TGC CAC TGG TGA ACG CT 3' 5' ACG CAC ACC CGG TGA CTG TG 3'	1998

A5 Veredlungen

Tab. A 5.1: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen (UL) 53 und 55 über Veredlungen (1996 bis 1998)

Tab. A 5.1: Regeneration results of the rootstocks 53 and 55 by graftings (1996 to 1998)

Tab. A 5.2: Ergebnisse der Regeneration der Unterlage (UL) 58 über Veredlungen (1996 bis 1998)

Tab. A 5.2: Regeneration results of the rootstocks 58 by graftings (1996 to 1998)

Tab. A 5.3: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen (UL) 1, 2, 96, 98 und 101 über Veredlungen (1997 und 1998)*Tab. A 5.3: Regeneration results of the rootstocks 1, 2, 96, 98 and 101 by graftings (1996 to 1998)*

UL	Veredlungs- unterlage	Pfropfpartner	1997			1998		
			April	Oktober	%	April	Oktober	%
1	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10	1	10			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	11	0	0	6	0	0
	Wurzelschnittling	‘Golden Delicious’	4	4	100			
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	11	5	45,5	10	6	60,0
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)				10	10	100
2	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10	6	60			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	18	6	33,3	6	0	0
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	20	11	55,0	9	3	33,3
	M 9	Wurzelschnittling (1998, grün)				5	5	100
96	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10	10	100			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	7	0	0	6	0	0
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	9	1	11,1	5	0	0
98	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10	10	100			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	10	0	0	8	0	0
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	4	0	0	11	1	9,1
101	Bittenfelder	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10	1	10			
	Bittenfelder	Wurzelschnittling	10	0	0	9	0	0
	Wurzelschnittling	‘Rotgestreifte Gelbe Schafsnase’	10	4	40	8	0	0

A 6 Verletzungen der Baumwurzeln

Tab. A 6: Wurzel- und Sproßbildung nach einer Verletzung der Wurzeln der Unterlage (UL) der Versuchsbäume am Standort (1996 und 1997)

Tab. A 6: Formation of shoots and roots after injuring the roots of the rootstocks at the origin location (1996 and 1997)

UL	Jahr	Wurzelbildung 1996, 1997	Anzahl Sprosse	
			1996	1997
53	1996	+	-	-
55		+	3	3
58		+	-	-
1	1997	+	-	-
2		+	-	-
53		+	-	-
55		+	-	-
58		+	-	-
96		+	-	-
98		+	-	-
101		+	-	-

A7 Morphologische Untersuchungen

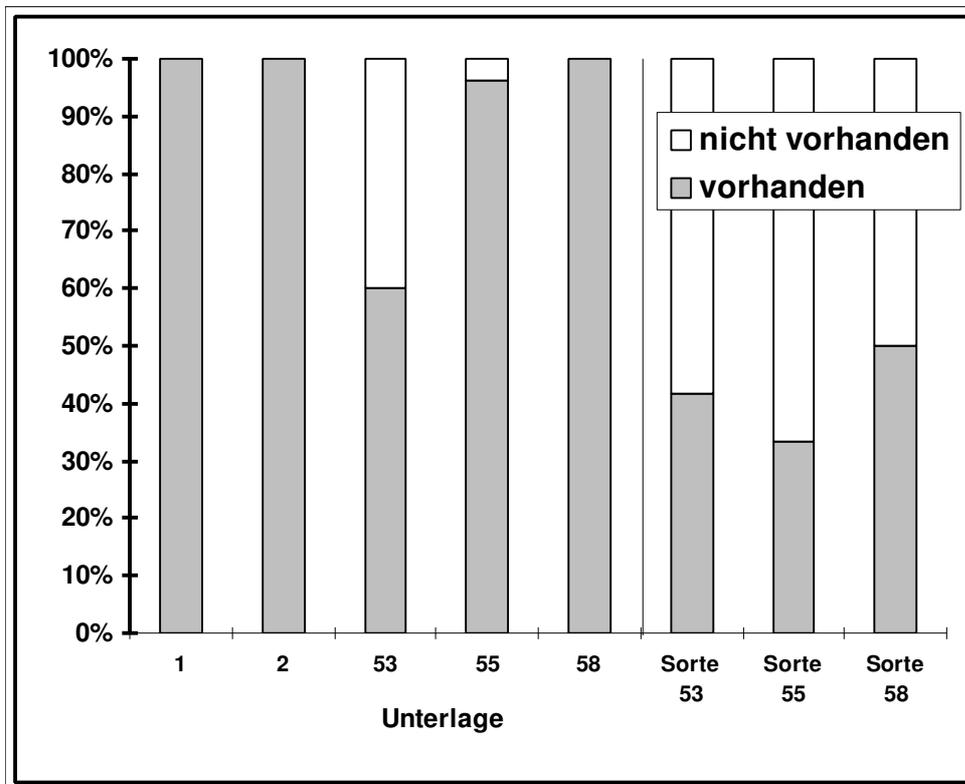


Abb. A 7.1: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58
Boniturmerkmal : Drüsen am Blattrand (1997)

Fig. A 7.1: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leaves of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58
Scoring sign: glandular leaf edge

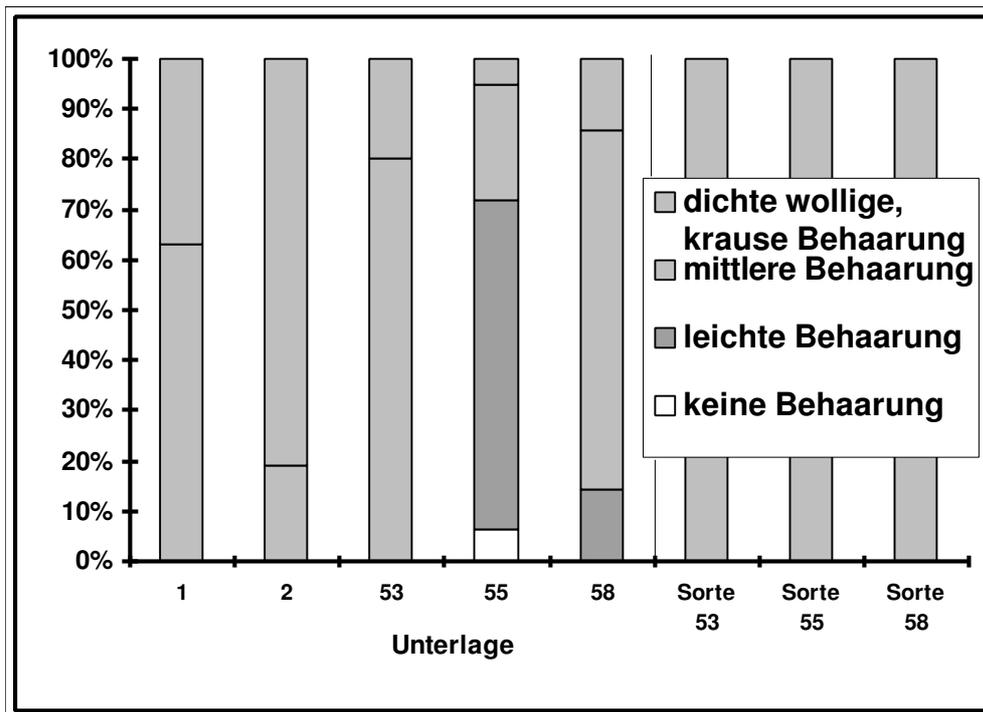


Abb. A 7.2: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58
Boniturmerkmal : Behaarung (1997)

Fig. A 7.2: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58
Scoring sigh: leaf hairs

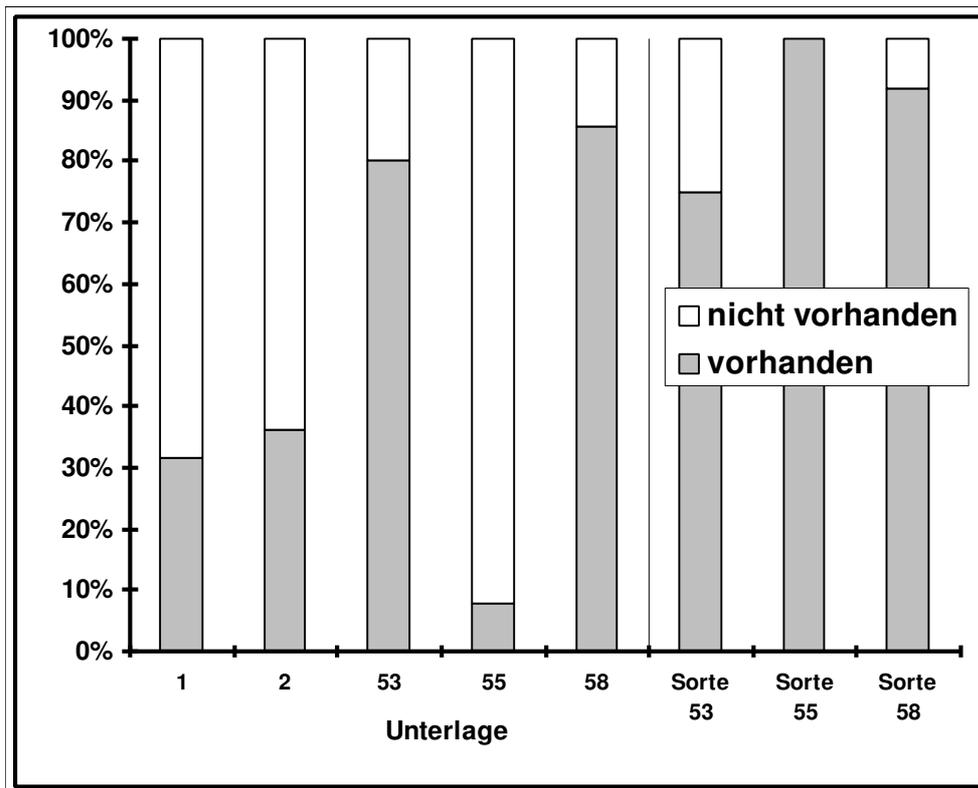


Abb. A 7.3: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58
Boniturmerkmal : Nebenblätter, 1997

Fig. A 7.3: Distribution percentage of the morphological characteristics for the leafs of the rootstocks 1, 2, 53, 55 and 58 and the cultivars of the trees 53, 55 and 58
Scoring sigh: stipules

A 8 Übersicht über die angewandten Regenerationsverfahren

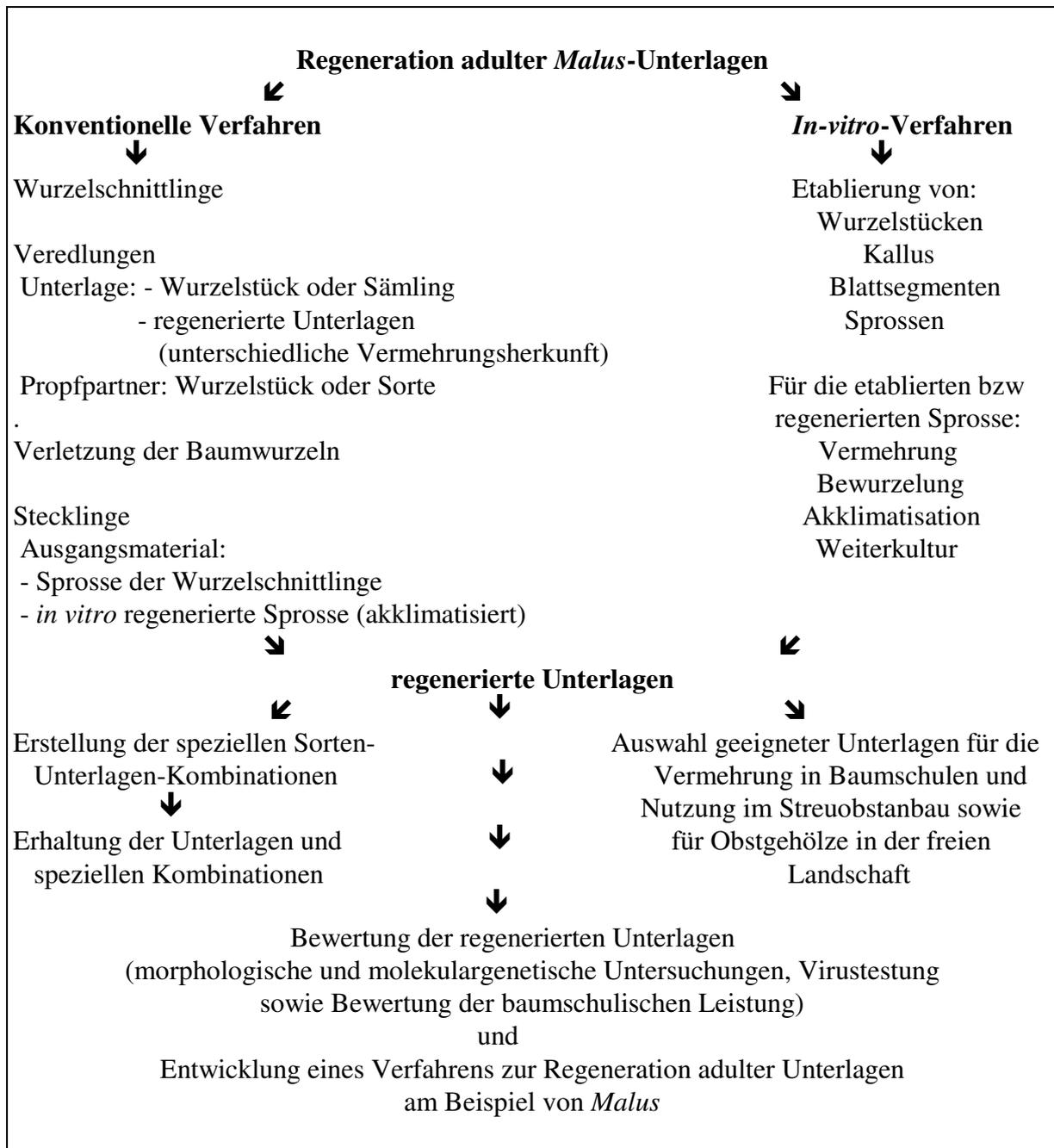


Abb. A 8: Übersicht über die angewandten Verfahren zur Regeneration adulter *Malus*-Unterlagen sowie über die Weiterverwendung und -behandlung der regenerierten Unterlagen

Fig. A 8: Procedures used for the regeneration of adult Malus-rootstocks and further treatment of the regenerated rootstocks

Verzeichnis der Definitionen

Wurzelschnittlingsvermehrung

$$\text{Regenerationsrate (RR, \%)} = \frac{\text{Anzahl Wurzelschnittlinge mit Sproß}}{\text{Anzahl gesteckter Wurzelschnittlinge}} \times 100$$

Stecklingsvermehrung

$$\text{Bewurzelungsrate (BWR, \%)} = \frac{\text{Anzahl bewurzelter Stecklinge}}{\text{Anzahl zur Bewurzelung gesteckter Sprosse}} \times 100$$

$$\text{Überwinterungsrate (ÜWR, \%)} = \frac{\text{Anzahl überwinterter bewurzelter Stecklinge}}{\text{Anzahl zur Bewurzelung gesteckter Sprosse}} \times 100$$

In-vitro-Versuche

$$\text{Akklimatisationserfolg I (\%)} = \frac{\text{Anzahl akklimatisierter Sprosse}}{\text{Anzahl bewurzelter Sprosse}} \times 100$$

$$\text{Akklimatisationserfolg II (\%)} = \frac{\text{Anzahl akklimatisierter Sprosse}}{\text{Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse}} \times 100$$

$$\text{Bewurzelungserfolg (\%)} = \frac{\text{Anzahl bewurzelter Sprosse}}{\text{Anzahl zur Bewurzelung aufgesetzter Sprosse}} \times 100$$

$$\text{Durchschnittliche Sproßanzahl} = \frac{\text{Gesamtanzahl der gebildeten Sprosse}}{\text{Anzahl zur Vermehrung aufgesetzter Sprosse}}$$

$$\text{Durchschnittliche Sproßlänge} = \frac{\text{Summe der Sproßlängen der einzelnen Sprosse}}{\text{Anzahl gemessener Sprosse}}$$

$$\text{Durchschnittliche Wurzelanzahl} = \frac{\text{Summe der Wurzelanzahl der einzelnen Sprosse}}{\text{Anzahl einbezogener Sprosse}}$$

$$\text{Durchschnittliche Wurzellänge} = \frac{\text{Summe der Wurzellängen der einzelnen Sprosse}}{\text{Anzahl einbezogener Sprosse}}$$

$$\text{Etablierungserfolg (\%)} = \frac{\text{Anzahl erfolgreich etablierter Explantate}}{\text{Anzahl zur Etablierung aufgesetzter Explantate}} \times 100$$

$$\text{Regenerationserfolg (\%)} = \frac{\text{Anzahl Explantate mit Sproß}}{\text{Anzahl zur Regeneration aufgesetzter Explantate}} \times 100$$

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Ernte- und Stecktermine der Wurzelschnittlinge (1996 bis 1998)	21
Tab. 2: Klasseneinteilung der geernteten Wurzelschnittlinge in Abhängigkeit vom Durchmesser (1996 bis 1998)	22
Tab. 3: Durchgeführte Veredlungskombinationen (1996 bis 1998)	24
Tab. 4: Stecktermine und Ausgangsmaterial für die Bewurzelungsversuche (1996 bis 1998)	26
Tab. 5: Verwendete Hormone und deren Konzentrationen in den Versuchen zur Regeneration über Wurzelstücke <i>in vitro</i> (1996 und 1997).	29
Tab. 6: Zusammensetzung der Medien zur Optimierung der Sproßvermehrung <i>in vitro</i> für die Unterlagen 53, 55, 58, 1 und 2 (1997).	32
Tab. 7: Bewurzelungs- und Akklimatisationstermine (1997 und 1998)	33
Tab. 8: In die Bonituren einbezogene Regenerate der Unterlagen 1, 2, 53, 55 und 58 sowie Pflanzen der Sorte der Bäume 53, 55 und 58 (1997).	36
Tab. 9: Anzahl gesteckter und getriebener Wurzelschnittlinge im Gewächshaus (1996 bis 1998) sowie die erzielten Regenerationsraten.....	45
Tab. 10: Anzahl gebildeter Sprosse der Wurzelschnittlinge im Mai und Oktober (1996, 1997 und 1998, im Gewächshaus).	47
Tab. 11: Ursprung der Sprosse der Wurzelschnittlinge (1997 und 1998, im Gewächshaus)	48
Tab. 12: Wurzelbildung an den Wurzelschnittlingen am Ende der Vegetationsperiode (1996 bis 1998, im Gewächshaus)	49
Tab. 13: Anzahl gesteckter und getriebener Wurzelschnittlinge im Freiland unter Folie (1996 bis 1998) sowie die erzielten Regenerationsraten.....	50
Tab. 14: Anzahl gebildeter Sprosse der Wurzelschnittlinge im Mai und Oktober (1996, 1997 und 1998, im Freiland unter Folie).	51

Tab. 15: Ursprung der Sprosse der Wurzelschnittlinge (1996 bis 1998, im Freiland unter Folie)	52
Tab. 16: Wurzelbildung an den Wurzelschnittlingen am Ende der Vegetationsperiode (1996 bis 1998, im Freiland unter Folie).....	53
Tab. 17: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen über Stecklinge (1996 bis 1998) Bewurzelungs- und Überwinterungsrate	58
Tab. 18: Prozentualer Anteil der Wurzelstücke mit Kallus in Abhängigkeit von der Auxinquelle im Medium nach zwei Subkulturen (1996)	60
Tab. 19: Erfolg der Sproßetablierung <i>in vitro</i> (1996, 1997 und 1998).....	61
Tab. 20: Etablierungserfolg der Sprosse der Unterlagen (1996 bis 1998)	61
Tab. 21: Anzahl an Sprossen der Unterlagen 53, 55, 58 (1996) sowie 1 und 2 (1997) in den ersten fünf Subkulturen.	62
Tab. 22: Durchschnittliche Sproßanzahl in Abhängigkeit vom Nährmedium und Empfehlung eines Vermehrungsmediums für die Sprosse der einzelnen Unterlagen (1997 und 1998)	63
Tab. 23: Durchschnittliche Sproßlänge in Abhängigkeit vom Nährmedium die Sprosse der einzelnen Unterlagen (1997 und 1998).....	64
Tab. 24: Wurzelanzahl und Wurzellänge in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung für die Sprosse der Unterlagen 55 und 58 (1997)	67
Tab. 25: Bewurzelungserfolg für die Sprosse der Unterlagen 1, 2, 55 und 58 zu unterschiedlichen Bewurzelungsterminen (1998)	67
Tab. 26: Wurzelanzahl und Wurzellänge in Abhängigkeit vom Bewurzelungszeitpunkt für die Sprosse der Unterlagen 1, 2, 55 und 58 (1998)	68
Tab. 27: Akklimatisationserfolg in Abhängigkeit vom verwendeten Medium für die Sprosse der Unterlagen 55 und 58 (1997).....	69
Tab. 28: Akklimatisationserfolg in Abhängigkeit vom Akklimatisationsbeginn für die Sprosse der Unterlagen 1, 2, 55 und 58 (1998).....	71
Tab. 29: Orte der Kallusinduktion an Blattsegmenten (1996)	72

Tab. 30: Größe der gebildeten Kalli an Blattsegmenten (1996).....	72
Tab. 31: DNA-Konzentration (ng/μl) der in die Versuche einbezogenen Unterlagen und Sorten (1997).....	77
Tab. 32: DNA-Konzentration (ng/μl) der in die Versuche einbezogenen Unterlagen und Sorten (1998).....	78
Tab. 33: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen (1996)	79
Tab. 34: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen (1997)	79
Tab. 35: Genetische Gleichheit zwischen Sorten und Unterlagen sowie der drei <i>M. sylvestris</i> -Herkünfte 1998.	82
Tab. 36: Ergebnisse der Virusuntersuchung (1998).	83
Tab. 37: Pflanzenbestand 1998; Regeneration der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58, 96, 98 und 101 über Veredlungen (1996 bis 1998).....	84

Tabellen im Anhang

Tab. A 2.1: Etablierungsvarianten der Wurzelstücke <i>in vitro</i> (1996 und 1997)	A 2
Tab. A 2.2.1: Grundzusammensetzung des verwendeten MS-Mediums <i>in vitro</i> (1996 bis 1998).....	A 7
Tab. A 2.2.2: Medium mit Zusatz von Ascorbinsäure und Aktivkohle <i>in vitro</i> (1996 bis 1998).....	A 8
Tab. A 2.2.3: Mediumzusammensetzung für die Vermehrung der Sprosse der Unterlagen <i>in vitro</i> (1996 bis 1998)	A 9
Tab. A 2.2.4: Mediumzusammensetzung für die Bewurzelung der Sprosse der Unterlagen <i>in vitro</i> (1997 und 1998).....	A 10
Tab. A 2.2.5: Mediumzusammensetzung für die Regenerationsversuche über Blattsegmente <i>in vitro</i> (1997 und 1998).....	A 11

Verzeichnis der Tabellen

Tab. A 2.3.1: Boniturschema zur Beurteilung der Kallusinduktion an Blattsegmenten (1996)	A 12
Tab. A 2.3.2: Boniturschema zur Beurteilung der Kallusgröße an Blattsegmenten (1996)	A 12
Tab. A 3.1: Boniturschema, Merkmal: Blattform	A13
Tab. A 3.2: Boniturschema, Merkmal: Blattspitze.....	A 13
Tab. A 3.3: Boniturschema, Merkmal: Blattrand.....	A 13
Tab. A 3.4: Boniturschema, Merkmal: Drüsen am Blattrand.....	A 13
Tab. A 3.5: Boniturschema, Merkmal: Behaarung.....	A 14
Tab. A 3.6: Boniturschema, Merkmal: Nebenblätter	A 14
Tab. A 4: In die PCR-Analyse einbezogene Primer (1996 bis 1998).....	A 15
Tab. A 5.1: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen 53 und 55 über Veredlungen (1996 bis 1998)	A 17
Tab. A 5.2: Ergebnisse der Regeneration der Unterlage 58 über Veredlungen (1996 bis 1998).....	A 18
Tab. A 5.3: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen 1, 2, 96, 98 und 101 über Veredlungen (1997 und 1998).....	A 19
Tab. A 6: Wurzel- und Sproßbildung nach einer Verletzung der Wurzeln der Unterlage der Versuchsbäume am Standort (1996 und 1997).....	A 20

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen 1, 2, 53 und 55 über Veredlungen, Anzahl vorhandener und nicht gelungener Veredlungen, Zusammenfassung der Jahre 1996 - 1998	54
Abb. 2: Ergebnisse der Regeneration der Unterlagen 58, 96, 98 und 101 über Veredlungen, Anzahl vorhandener und nicht gelungener Veredlungen, Zusammenfassung der Jahre 1996 - 1998	55
Abb. 3: Sproß- und Wurzelbildung nach Verletzung der Wurzeln der Unterlage 55 (1996).....	57
Abb. 4: Bewurzelungserfolg der Sprosse der Unterlagen 55 und 58 <i>in vitro</i> (1997); Bewurzelung auf mit Agar verfestigtem Medium (A/A) nach sieben und acht Subkulturen.....	65
Abb. 5: Bewurzelungserfolg der Sprosse der Unterlagen 55 und 58 <i>in vitro</i> (1997); Vergleich der Verfestigungsmittel im Medium.....	66
Abb. 6: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58; Boniturmerkmal: Blattform (1997)	73
Abb. 7: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58. Boniturmerkmal: Blattspitze (1997).....	74
Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen 1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58 Boniturmerkmal: Blattrand (1997).....	75
Abb. 9: DNA-Fingerprint nach der RAPD-Amplifizierung für die Unterlagen und Sorte der Versuchsbäume sowie der drei einbezogenen <i>M. sylvestris</i> -Herkünfte (1998).....	80
Abb. 10: Dendrogramm der Unterlagen, Sorten und <i>M. sylvestris</i> -Herkünfte (1998)	81

Abb. 11: Pflanzenbestand (1998), gesamt und je Vermehrungsart für die Unterlagen
der Bäume 1, 2 und 53..... 85

Abb. 12: Pflanzenbestand (1998), gesamt und je Vermehrungsart für die Unterlagen
der Bäume 55, 58, 96, 98 und 101..... 86

Abbildungen im Anhang

Abb. A 1: Standorte der ausgewählten Bäume für die Versuche zur Regeneration
adulter UnterlagenA 1

Abb. A 7.1: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen
1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58;
Boniturmerkmal: Drüsen am Blattrand (1997)A 21

Abb. A 7.2: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen
1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58;
Boniturmerkmal: Behaarung (1997).....A 22

Abb. A 7.3: Prozentuale Verteilung der Boniturnoten für die Blätter der Unterlagen
1, 2, 53, 55, 58 und die der Sorte der Bäume 53, 55 und 58;
Boniturmerkmal: Nebenblätter (1997)A 23

Abb. A 8: Übersicht über die angewandten Verfahren zur Regeneration adulter
Malus-Unterlagen sowie über die Weiterverwendung und -behandlung
der regenerierten UnterlagenA 24