

Regulierung der Winterruhe bei Apfel im Klimawandel

Anton Milyaev^{1,2}, Yudelsy Antonia Tandron Moya³, Ute Born¹, Eike Lüdeling², Henryk Flachowsky⁴, Nicolaus von Wirén³

¹Universität Hohenheim, Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Fachgebiet Produktionssysteme der Sonderkulturen (340f), Emil-Wolff-Straße 25, 70599 Stuttgart

²Universität Bonn, INRES – Gartenbauwissenschaften, Auf dem Hügel 6, 53121 Bonn

³Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abteilung Physiologie und Zellbiologie, Corrensstr. 3, 06466 Stadt Seeland, OT Gatersleben

⁴Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Züchtungsforschung an Obst, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Pillnitzer Platz 3a, 01326 Dresden

Abschlussbericht

zum Forschungsprojekt

Regulierung der Winterruhe bei Apfel im Klimawandel

1. Einleitung

In der globalen Obstproduktion nimmt der Apfel mit 93,14 Millionen Tonnen (im Jahr 2021) nach Bananen und Wassermelonen den dritten Platz ein (FAOSTAT, 2023). Laut Statistischem Bundesamt (Statistisches Bundesamt, 2023) wurden im selben Jahr in Deutschland eine Million Tonnen Äpfel produziert. Diese Zahlen in Verbindung mit den zahlreichen positiven Effekten von Äpfeln auf die menschliche Gesundheit (Hyson 2011; Zhang *et al.* 2021) unterstreichen die Bedeutung dieser Obstart für die gesunde Ernährung der Bevölkerung. In Deutschland ist der Apfel das meistverzehrte Obst. Sein Verbrauch lag im Jahr 2021 bei 22,4 kg pro Kopf (Statista, 2023), dabei deckt die heimische Apfelproduktion nur die Hälfte der benötigten Menge. Daraus ergibt sich ein großes Potenzial für die Ausweitung der deutschen Apfelproduktion, die mindestens verdoppelt werden könnte, um den lokalen Bedarf an Frischobst zu befriedigen. Allerdings ist die Produktion von Äpfeln in Europa durch den Klimawandel zunehmend gefährdet (Dalhaus *et al.* 2020). Dies bezieht sich vor allem auf die deutliche Erhöhung der Durchschnittstemperatur im Winter, die sich wiederum negativ auf die Synchronität des Knospenaufbruchs und auf den Blühzeitpunkt im Frühling auswirkt (Vitasse and Rebetez 2018; Koehler and Milyaev 2022).

Phänologische Untersuchungen haben gezeigt, dass in den letzten Jahren der Knospenaufbruch bei Apfel im Vergleich zu langjährigen Durchschnittswerten ca. 12 Tage früher auftritt (Bissolli *et al.* 2007; Würtz 2016). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Spätfröste die austreibenden Knospen schädigen, was zu erheblichen Ertragsausfällen führen kann (Drepper *et al.* 2021). Die letzten Beispiele extensiver Knospenschädigungen von Obstkulturen durch Frühlingsfröste in Europa wurden im April 2017 dokumentiert. Die dadurch verursachten Ertragsverluste bei Obstkulturen und Weinreben aus kommerziellen Anlagen betragen ca. 3,3 Milliarden Euro (Vitasse and Rebetez 2018). Ähnliche Verluste waren auch im März 2020 in der Bodensee-Region zu verzeichnen (Allon 2020; persönliche Kommunikation).

Aktuelle Klimastudien zeigen, dass die Häufigkeit der Frühlingsfröste seit mehreren Jahrzehnten stabil ist. Es steigt jedoch die Anzahl der Tage mit einer Durchschnittstemperatur über 5°C im Spätwinter und im Frühling an (Vitasse and Rebetez 2018). Dies ist der Grund für die frühzeitige Knospenentwicklung und die daraus resultierende Gefahr von Frostschäden an Knospen in besonders frostempfindlichen Entwicklungsstadien.

Ein weiteres Problem, welches der Klimawandel mit sich bringt, ist unzureichende Kälte im Winter, die somit nicht mehr als Synchronisierungsfaktor für einen gleichzeitigen Aufbruch der Knospen im Frühling dienen kann (Koehler and Milyaev 2022). Die Kältemenge, welche die Apfelbäume im Winter benötigen, wird als Kältebedürfnis bezeichnet, welches oft in Chill Portions (CP) gemessen wird (Fishman *et al.* 1987a; b). Unsere Studien zeigten, dass die in Baden-Württemberg angebauten kommerziellen Apfelsorten zwischen 55 und 75 CP brauchen, damit die Knospen im Frühling normal und synchron austreiben, während die Winterbedingungen in Süddeutschland zurzeit ca. 110 CP anbieten (Milyaev *et al.* 2021, Milyaev *et al.* eingereichtes Manuskript). Die Modellierung des zukünftigen Verlaufs der Erderwärmung deutet allerdings darauf hin, dass sich das Kälteangebot in manchen Regionen Europas bis Ende des 21. Jahrhunderts stark verringern wird (Luedeling and Brown 2011).

Sollten die Bäume keinen ausreichenden Kältereiz im Winter bekommen, reduziert sich die Anzahl der im Frühling aufbrechenden Knospen und somit auch der Fruchtbehang erheblich (Saure 1985). Dies könnte die Wirtschaftlichkeit des Apfelanbaus in Deutschland gefährden.

Um diesen Problemen auf züchterischer Ebene zu begegnen, soll ein umfangreiches und langfristiges Züchtungsprogramm zur Entwicklung von neuen Sorten durchgeführt werden. Es wird erwartet, dass erst nach mehreren Jahrzehnten eine neue klimaadaptierte Apfelsorte angebaut werden kann, weil der Züchtungsvorgang sowie die anschließende Sortenprüfung ziemlich zeitaufwendig sind. Die Obstproduzenten benötigen allerdings bereits heute eine effektive Methode zur zeitlichen Anpassung der phänologischen Entwicklung der Knospen im Frühling. Am besten sollte solch eine Methode auf natürlich vorkommenden pflanzlichen Metaboliten mit regulatorischer Wirkung auf die Winterruhe (Dormanz) der Knospen basieren. Die natürlichen Signalmoleküle, welche die Knospendormanz bei Apfel regulieren, sind noch weitgehend unbekannt und sollen in dieser Studie identifiziert werden. Sobald sie identifiziert sind, könnte die Blühzeit bestimmter Apfelsorten durch eine externe Applikation von natürlichen Substanzen, deren synthetischen Analogen oder gegenwirkenden Molekülen an die dynamisch ändernden Klimabedingungen angepasst werden.

Als Vorarbeit zu dieser Studie wurde ein Klimakammerexperiment mit zwei kommerziellen Apfelsorten bereits durchgeführt, in dem der Dormanzverlauf, sowie die einzelnen Dormanzphasen (Para-, Endo- und Ecodormanz) identifiziert wurden. Apfelknospen, die in diesem Versuch über den gesamten Verlauf der Dormanzperiode gesammelt wurden, wurden mithilfe von Massenspektrometrie analysiert. Das Hauptziel dieser Studie war, nach denjenigen Metaboliten und Phytohormonen in Apfelknospen zu suchen, welche bei fehlendem Kältereiz den synchronen Austrieb der Knospen stimulieren können und auch nach solchen, die bei zu hoher Wintertemperatur den Knospenaustrieb bei Apfel vorübergehend hemmen können, um die Knospen durch die Verzögerung ihrer phänologischen Entwicklung von wiederkehrender Kälte zu schützen.

2. Material und Methoden

Klimakammerexperiment und Probenahme. Das Probenmaterial stammte aus der Versuchsplantage der Universität Hohenheim (48°42'44.3 "N 9°11'33.5 "E) mit 14-jährigen Apfelbäumen, die auf 'M.9'-Unterlagen veredelt wurden. Um den gesamten Verlauf der Winterruhe bei Apfel zu bestimmen, wurden jeweils 6 repräsentative Äste von den 2 kommerziellen Apfelsorten 'Nicoter' (Kanzi ®) und 'Topaz' von Juni 2021 bis März 2022 wöchentlich abgeschnitten (31 Probenahmen). Die Äste wurden entblättert, in Wasser gestellt und unter knospenaufbruchsfördernden Bedingungen für 42 Tage (6 Wochen) in der Klimakammer gehalten. Die Klimakammerbedingungen wurden wie folgt eingestellt: Temperatur 23,5°C (Tag/Nacht), 16 h Licht maximaler Intensität (700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), relative Luftfeuchtigkeit 70%. Die Entblätterung der Äste in Kombination mit den oben erwähnten Klimakammerbedingungen hat zum Knospenaufbruch der „nicht dormanten“ Knospen geführt, während die Knospen, die bereits in der Ruhephase waren, nicht austrieben. Jede aufgebrochene Knospe sowie die Zeit des Knospenaufbruchs (als Tage nach der Probenahme) wurden dokumentiert. In diesem Klimakammerversuch wurden nur Apfelknospen an kurzen Trieben (<5 cm) berücksichtigt, da die absolute Mehrheit von diesen Trieben primäre Blüten enthalten

und daher als erste im Frühling des darauffolgenden Jahres austreiben. Gleichzeitig mit den Ästen wurden Kurztriebknospen in 4 biologischen Replikaten gesammelt (1 Baum = 1 biologisches Replikat). Die Anzahl der Knospen betrug 10 pro Replikat, pro Sorte und pro Zeitpunkt. Alle Knospen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert bis sie für die geplanten Analysen verwendet wurden.

Analyse von Phytohormonen und anderen Metaboliten. Um die Frage zu beantworten, welche Substanzen den Verlauf der Winterruhe bei Apfel regulieren, wurden alle messbaren Phytohormone (41 Substanzen, gezielte Detektionsmethode) und andere Metabolite (ungezielte Detektionsmethode) in den Apfelknospen mithilfe der Massenspektrometrie untersucht. Die gezielte Detektionsmethode für die robuste Identifikation von Phytohormonen wurde in unserer früheren Veröffentlichung ausführlich beschrieben (Milyaev *et al.* 2022). Die ungezielte Detektionsmethode wurde für die Suche nach allen detektierbaren Substanzen verwendet, die normalerweise im Vergleich mit Phytohormonen höhere Konzentrationen im Pflanzengewebe aufweisen. Für diese Analyse wurde die LC-HRMS-Methode (engl.: liquid chromatography with high resolution mass-spectrometer) verwendet. Die Molekulargewichte sowie die Fragmentierungsmuster aller gemessenen Signale (potentielle Metabolite) wurden mit einer der besten Massenspektraldatenbanken (mzCloud, <https://www.mzcloud.org/>) entsprechenden Kandidatensubstanzen zugeordnet (mit einer Erkennungswahrscheinlichkeit von >85%). Alle Signale mit fehlenden Fragmentierungsspektren wurden ausgefiltert. Die vollständige (komplette) Identifikation der zu der Datenbank zugeordneten Metabolite ist nur dann sinnvoll, wenn diese zur Beantwortung unserer Versuchsfrage dienen. Bis dahin sollte der Begriff „identifiziert“ bei der ungezielten Detektionsmethode vermieden werden. Die beiden Analysen wurden am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK Gatersleben), Abteilung Physiologie und Zellbiologie, durchgeführt.

Die Apfelknospen, die über den gesamten Verlauf der Winterruhe (25. August 2021 - 23. Februar 2022) gesammelt wurden (2 Sorten x 22 Zeitpunkte x 4 Replikate + 10 Kalibrierungsproben = 186 Proben), wurden mit beiden Methoden analysiert, um die Vielfalt potentieller Signalsubstanzen bestmöglich abzudecken. Nach der Massenspektrometrie wurde eine Zeitreihenanalyse durchgeführt, um die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen aller nachgewiesenen Substanzen mit dem Verlauf des Knospenaufbruchs (im Klimakammerversuch) abzugleichen und somit mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Parametern zu finden. Die Statistische Analyse, sowie die grafische Darstellung der Ergebnisse wurden mithilfe von SigmaPlot, v.14.0 (Systat Software Inc., Palo Alto, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die Auswertung der phänologischen Daten aus dem Klimakammerversuch zeigte, dass die Apfelbäume im Freiland bereits im Oktober (2021) in die Ruhephase eingetreten waren (kein Knospenaufbruch nach 42 Tagen in der Klimakammer). Der Anteil der austreibenden Knospen hat sich von Ende November bis Mitte Januar kontinuierlich erhöht und Mitte Januar über 90% erreicht. Dies wurde als Ende der Winterruhe bezeichnet (Abb. 1).

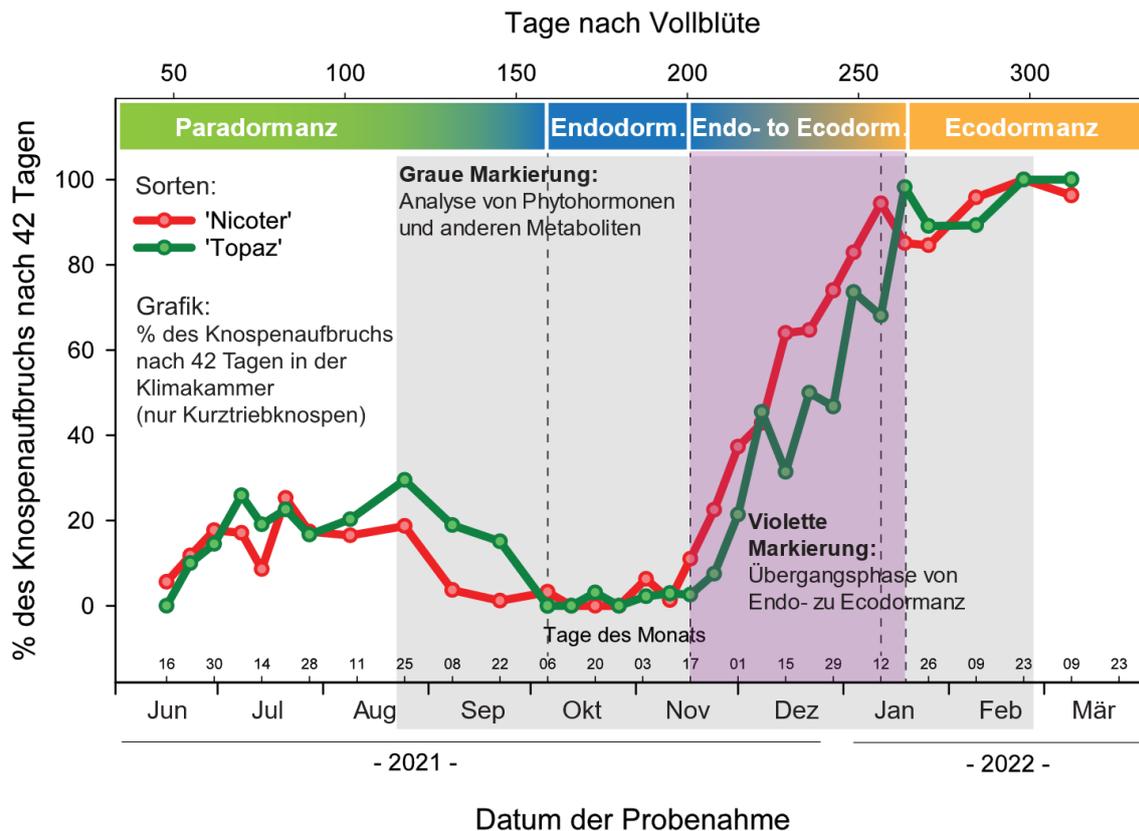


Abbildung 1. Experimentell bestimmter Verlauf der Winterruhe bei ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ mit drei bekannten Phasen: Paradormanz (Vorruhe), Endodormanz (echte Winterruhe) und Ecodormanz (Nachruhe). Die Äste von ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ wurden zu jedem in der Abb. 2 gezeigten Datum im Feld geschnitten, in Wasser gestellt und anschließend in die Klimakammer gebracht. Die Abbildung zeigt die Anteile der austreibenden Knospen nach 42 Tagen in der Klimakammer. Die x-Achse zeigt Mittwoch, da die Probenahmen in den Jahren 2021-2022 hauptsächlich mittwochs stattfanden.

Nachdem sichergestellt wurde, dass die Probenahmen den kompletten Dormanzverlauf von ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ abgedeckt hatten, wurde die Analyse von 41 Phytohormonen (Tabelle 1) und anderen nachweisbaren Metaboliten in Apfelknospen beider Sorten durchgeführt. Der Zeitraum für die detaillierte Untersuchung unserer Versuchsfrage beinhaltete insgesamt 22 Probenahmen und lag vom 25. August 2021 bis 23. Februar 2022 (Abb. 1). Diese Periode deckt 3 bekannte Dormanzphasen ab: einen Teil der Dormanzphase im Sommer (Paradormanz oder Vorruhe – schwacher Knospenaufbruch unter optimalen Wachstumsbedingungen), tiefe Dormanz im Herbst und im Winter (Endodormanz – fast kein oder gar kein Knospenaufbruch unter optimalen Wachstumsbedingungen) und die Nachruhe (Ecodormanz – alle gesunden Knospen brechen unter optimalen Wachstumsbedingungen auf). Das Phytohormonprofil beider Apfelsorten zeigte, dass 23 Phytohormone in den Knospen erfolgreich nachgewiesen wurden, und dass 2 davon unter der Nachweisgrenze lagen und somit nicht quantifizierbar waren (Tabelle 1).

Für alle 21 quantifizierbaren Phytohormone führten wir eine Zeitreihenanalyse durch, die signifikante zeitliche Änderungen der Konzentrationen von 10 Phytohormonen in den Phasen

Endo- und Ecodormanz zeigte (Abb. 2a-d), während die Konzentrationen der restlichen 11 Substanzen sich in diesen Phasen nicht bedeutsam änderten.

Tabelle 1. Übersicht der Phytohormone, die in den Apfelknospen analysiert wurden

Nr.	Klassen	Substanzen	Abkürzung	Phytohormone in Apfelknospen
1	CK	N6-isopentenyladenine	iP	+
2	CK	N6-isopentenyladenenosine	iPR	+
3	CK	trans-zeatin	tZ	+
4	CK	cis-zeatin	cZ	n/n
5	CK	trans-zeatin riboside	tZR	+
6	CK	cis-zeatin riboside	cZR	+
7	CK	Dihydrozeatin	DHZ	n/n
8	CK	Dihydrozeatin riboside	DHZR	+
9	CK	trans-zeatin-O-glucoside	tZOG	n/n
10	CK	trans-zeatin riboside-O-glucoside	tZROG	+
11	Auxin	Indol-3-acetic acid	IAA	+
12	Auxin	2-oxoindole-3-acetic acid	OxIAA	≤NG
13	Auxin	Indole-3-acetyl-L-Glutamic acid (IAA-glutamate)	IAA-Glu	n/n
14	Auxin	Indole-3-acetyl-L-Aspartic acid (IAA-aspartate)	IAA-Asp	≤NG
15	Auxin	Indole-3-acetyl-L-alanine	IAA-Ala	n/n
16	JA	Jasmonic acid	JA	+
17	JA	Jasmonic acid Isoleucin	JA-Ile	+
18	SA	Salicylic acid	SA	n/n
19	SA	Salicylic acid 2-O-β-D-glycoside	SAG	+
20	ABA	Abscisic acid	ABA	+
21	ABA	ABA-glutamate	ABA-Glu	+
22	ABA	Abscisic acid Glycosyl ester	ABA-Glc	n/n
23	ABA	Phaseic acid	PA	+
24	ABA	Dihydrophaseic acid	DPA	+
25	GA	Gibberellin A1	GA1	n/n
26	GA	Gibberellin A3	GA3	n/n
27	GA	Gibberellin A4	GA4	n/n
28	GA	Gibberellin A5	GA5	n/n
29	GA	Gibberellin A6	GA6	n/n
30	GA	Gibberellin A7	GA7	n/n
31	GA	Gibberellin A8	GA8	n/n
32	GA	Gibberellin A9	GA9	+
33	GA	Gibberellin A12	GA12	+
34	GA	Gibberellin A15	GA15	+
35	GA	Gibberellin A19	GA19	+
36	GA	Gibberellin A20	GA20	n/n
37	GA	Gibberellin A24	GA24	n/n
38	GA	Gibberellin A29	GA29	n/n
39	GA	Gibberellin A44	GA44	n/n
40	GA	Gibberellin A51	GA51	+
41	GA	Gibberellin A53	GA53	+

„+“ – das entsprechende Phytohormon wurde nachgewiesen und quantifiziert; ≤NG (≤ Nachweisgrenze) – das entsprechende Phytohormon wurde nachgewiesen, aber NICHT quantifiziert; n/n – das entsprechende Phytohormon wurde NICHT nachgewiesen. Klassen der Phytohormone: CK – Cytokinine, JA- Jasmonsäure, SA – Salicylsäure, ABA – Abscisinsäure, GA – Gibberelline.

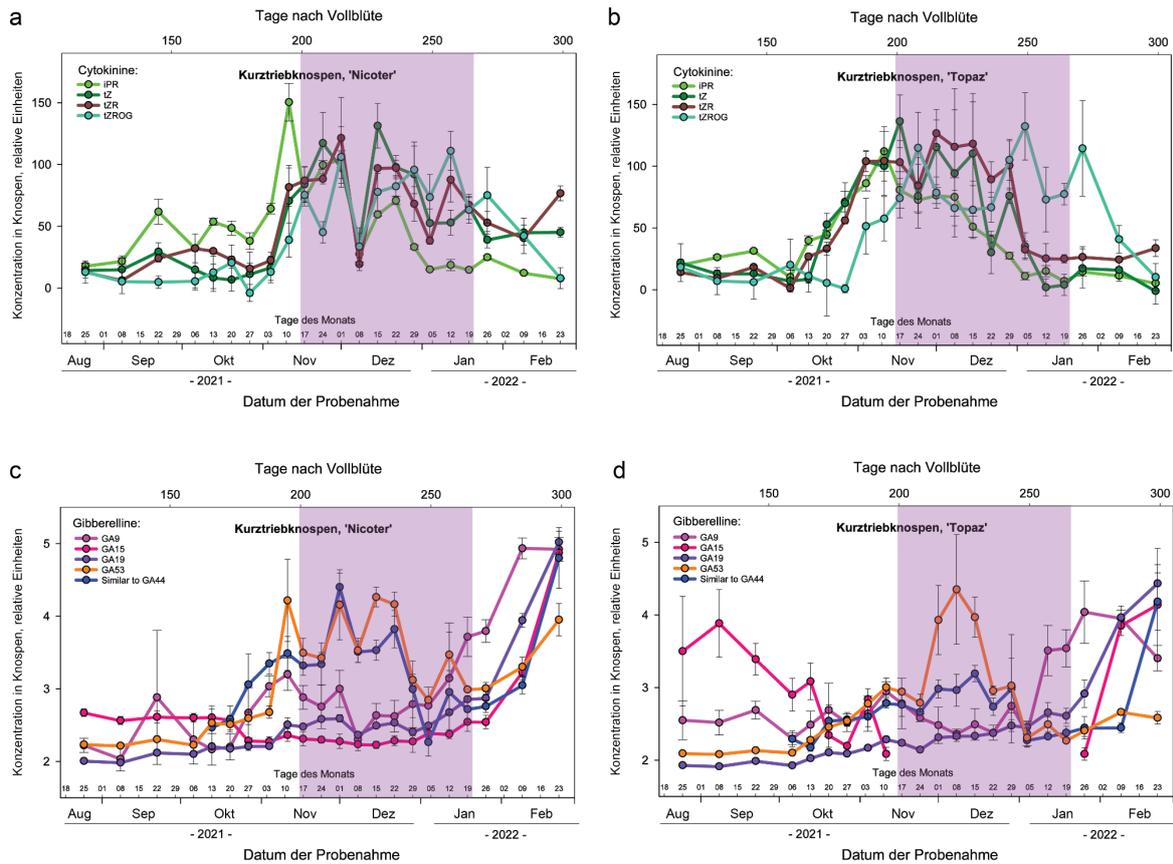


Abbildung 2. Zeitliche Änderungen der Konzentrationen von Cytokinin (a, b) und Gibberellinen (c, d) in Apfelknospen von ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ während der gesamten Dormanzperiode. Der violett markierte Bereich zeigt die Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz. Um die Vergleichbarkeit der Verläufe einzelner Phytohormone zu gewährleisten, wurden die Konzentrationen gezeigter Substanzen zur gleichen Skalierung adaptiert. Daher repräsentiert die y-Achse nur relative Einheiten. Der natürliche Knospenaufbruch in der Apfelanlage in Hohenheim fand am 20. März 2022 für beide Apfelsorten statt.

Die zeitlichen Verläufe der gemessenen Phytohormone zeigten, dass die Konzentrationen einzelner Cytokinine (iPR, tZ, tZR, tZROG; für die volle chemische Bezeichnung siehe Tab. 1) bereits in der Endodormanzphase anstiegen. Der Anstieg der Konzentration von Gibberellin GA53 und von einer GA-ähnlichen Substanz (Similar to GA44) fand entweder synchron mit Cytokinin (bei ‚Nicoter‘) oder mehrere Wochen später (bei ‚Topaz‘) statt. Der Begriff „GA44-ähnliche Substanz“ beschreibt eine noch nicht charakterisierte chemische Verbindung, deren Struktur Ähnlichkeiten mit GA44 aufwies. Kurz vor Beginn der nächsten Dormanzphase (Ecodormanz) sank der Gehalt der erwähnten Gibberelline in den Knospen deutlich. Die Konzentration mehrerer Cytokinine sank wieder kurz vor (‚Topaz‘) oder kurz nach dem Beginn der Ecodormanz (‚Nicoter‘). Im Gegensatz zu den Cytokinin, deren Konzentration in der Ecodormanzphase niedrig blieb, stiegen die Gehalte mehrerer Gibberelline ca. 4 Wochen vor dem natürlichen Knospenaufbruch (im Feld) erheblich an (Abb. 2 c, d). Zu diesen Substanzen gehören GA9, GA15, GA19, GA53 sowie die GA44-ähnliche Substanz.

Im Gegensatz zu den Konzentrationen beschriebener Cytokinine und Gibberelline gab es im gesamten Phytohormonprofil nur ein einziges Phytohormon, dessen Abundanz in den Knospen über den gesamten Zeitraum der Probenahme hinweg kontinuierlich gesunken ist. Dies war die Abscisinsäure (Abb. 3a). Da sich die Wirkungsweise von Signalsubstanzen in Pflanzen nicht allein aus unabhängigen Konzentrationen einzelner Hormone ergibt, sondern das Resultat eines hormonellen Gleichgewichtes ist, haben wir versucht, Zusammenhänge zwischen dem Verlauf des Knospenaufbruchs im Klimakammerversuch und den Konzentrationen nachgewiesener Phytohormone zu finden. Angenommen, dass eine Einheit wachstumsfördernder Hormone (wie z.B. Cytokinine und Gibberelline) benötigt wird, um einer Einheit wachstumshemmender Hormone (wie z.B. Abscisinsäure) entgegenzuwirken, kann man basierend auf unseren Daten ein Verhältnis zwischen der Abscisinsäure und der Summe von Cytokinin- und Gibberellinen darstellen. Für die Berechnung dieses Verhältnisses brachten wir die Summe von Cytokinin- und Gibberellinen auf die gleiche Skalierung mit der Abscisinsäure, damit eine Einheit der Summe „Cytokinine + Gibberelline“ einer Einheit von Abscisinsäure entsprach. Für die Summe wachstumsfördernder Phytohormone wählten wir die Vorstufe für viele bekannten Cytokinine – iPR, die biologisch aktiven Cytokinine – tZ und tZR sowie das einzige Gibberellin, dessen Konzentration in beiden Sorten in der Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz anstieg (GA53). Die grafische Darstellung des daraus resultierten Verhältnisses $ABA : (iPR + tZ + tZR + GA53)$ ergab 2 ähnliche Kurven (für ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘), die einen umgekehrten Verlauf zu den Kurven des Knospenaufbruchs zeigen (Abb. 3b).

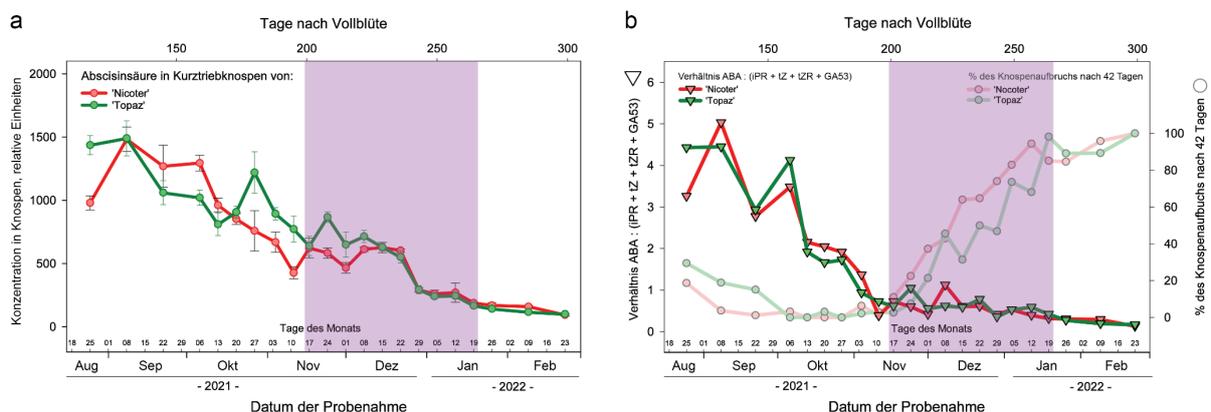


Abbildung 3. Zeitliche Änderungen der Konzentrationen von Abscisinsäure (a) und das Verhältnis ABA: (iPR + tZ + tZR + GA53) (b) in Apfelknospen von ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ während der gesamten Dormanzperiode. Der violett markierte Bereich zeigt die Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz. Für die Berechnung des Verhältnisses zwischen ausgewählten Phytohormonen wurde sowohl die Summe von iPR + tZ + tZR + GA53 als auch die Konzentration von ABA zur gleichen Skalierung adaptiert.

Mit der ungezielten Detektionsmethode der Naturstoffe konnten 64 massenspektrometrische Signale mit einer Wahrscheinlichkeit von >85% bestimmten Substanzen zugeordnet werden (Abb. 4). Insbesondere haben uns in dem Metabolitenprofil jegliche Signalsubstanzen interessiert, deren Gehalt vor oder während der Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz anstieg (potenziell fördernde Wirkung auf den Knospenaufbruch) oder solche, deren Konzentration in dieser Übergangsphase kontinuierlich gesunken ist (potenziell hemmende Wirkung auf den Knospenaufbruch). Die wenigen Substanzen im Metabolitenprofil, deren

wachstumsregulatorische Wirkungen bekannt sind, waren Spermidin (Abb. 4, Substanz 6) und Abscisinsäure (Abb. 4, Substanz 10). Die Konzentrationsverläufe beider Substanzen waren ähnlich, was die hierarchische Clusteranalyse bestätigte. Interessanterweise stiegen die Gehalte einiger Aminosäuren in den Knospen mehrere Wochen vor dem Übergang von Endo- zu Ecodormanz an (Abb. 4, Substanzen 25, 28, 30, 31, 32, 40, 41).

4. Diskussion

In vielen wissenschaftlichen Arbeiten wurden Phytohormone als regulatorische Substanzen für Winterruhe in Obstbäumen diskutiert (Saure 1985; Erez *et al.* 2008; Bound *et al.* 2022). Allerdings wurden Phytohormone nur in wenigen Studien bei Obstbäumen tatsächlich gemessen und in Zusammenhang mit dem Dormanzstatus der Bäume betrachtet (Bound *et al.* 2022; Götz *et al.* 2023). Bisher ist uns keine Studie bekannt, in der Phytohormonprofile der Knospen mit einem detaillierten Klimakammerversuch in Verbindung gebracht wurden.

Bound *et al.* (2022) hat in seiner Dormanzstudie mit Süßkirsche (*Prunus avium*) eine potentiell dormanzbrechende Wirkung mancher Cytokinine bereits vermutet (wie z.B. iPR, c+tZ, c+tZR, DHZ, DHZR; c+t: die cis- und trans-Formen wurden in Knospen zusammen gemessen). Unsere Studie zeigte, dass die Konzentrationen von iPR, tZ, tZR, tZROG in Apfelknospen vor der Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz anstiegen (Abb. 2a, b). Dies weist darauf hin, dass diese Phytohormone als potentiell dormanzbrechende Substanzen mehr Aufmerksamkeit in der weiteren Dormanzforschung bekommen sollten.

Über die potentiell knospenaufbruchsfördernde Wirkung bestimmter Gibberelline ist in der wissenschaftlichen Literatur auch wenig bekannt. Eine Studie berichtete, dass die wässrige Lösung von GA4 (100 µM), in die das Steckholz von Japanischer Aprikose (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) für 10 Tage gestellt wurde, die Anzahl der aufgebrochenen Knospen erhöhte (Zhuang *et al.* 2013). Eine andere Studie wies darauf hin, dass zwei Spritzungen mit GA3 (500 ppm) zur verfrühten Blüte bei *Rhododendron pulchrum* führten (Chang and Sung 2000). Die biologisch aktiven Gibberelline (GA1, GA3, GA4 und GA7) wurden in Knospen von ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ nicht nachgewiesen (vermutlich wegen ihrer sehr geringen Konzentration in Apfelknospen). Außerdem stiegen die Gehalte von GA9, GA15 und GA19 in Apfelknospen nur dann an, wenn die Dormanzperiode der Knospen bereits endete (Abb. 2c, d). Dies deutet darauf hin, dass diese Gibberelline für die Steuerung der Knospenentwicklung im Frühling zuständig sein können und nicht für die Dormanzbrechung. Im Gegensatz stiegen die Konzentrationen von GA53 und der GA44-ähnlichen Substanz in der Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz an und wurden somit als Substanzen mit potentiell dormanzbrechender Wirkung vermutet.

Abscisinsäure (ABA) ist seit Jahren als negativer Regulator der Samenkeimung bekannt (Schopfer *et al.* 1979) und zeigte dieselbe Wirkung auf den Aufbruch der Knospen bei Weintraube (*Vitis vinifera*) (Zheng *et al.* 2015). Unsere Studie fand heraus, dass die Konzentration von ABA in Apfelknospen von August bis Februar kontinuierlich gesunken ist (Abb. 3a). Dies dient als weiteres Indiz dafür, dass die hohen ABA-Gehalte in Knospen den Austrieb hemmen oder verzögern könnten. Die ungezielte Detektionsmethode der Naturstoffe zeigte, dass eine Substanz, deren Grundstruktur als Benzoessäure in der Metabolitendatenbank erkannt wurde, einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie ABA in Apfelknospen hatte (Abb.

4, Substanz 9). Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung zeigte, dass die Benzoesäure eine hemmende Wirkung auf die Keimung der Samen von Kronenwucherblume (*Chrysanthemum coronarium*) hatte (Ma *et al.* 2020). In der wissenschaftlichen Literatur fanden wir keine weiteren Daten, die die Rolle der Benzoesäure in der Dormanz höherer Pflanzen erläutern. Darüber hinaus gibt es auch keine Veröffentlichungen, die zumindest eine teilweise Erklärung liefern, warum die Gehalte mancher Aminosäuren in Apfelknospen bereits in der Endodormanzphase anstiegen oder warum die Konzentration von Spermidin in Knospen einen ABA-ähnlichen Verlauf hatte. Dies sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

5. Empfehlungen für die weitere praxis-orientierte Forschung

Das Hauptziel dieser Studie war, nach denjenigen Metaboliten und Phytohormonen in Apfelknospen zu suchen, welche potenziell zur zeitlichen Anpassung des Knospenaufbruchs bei Apfel in der Praxis verwendet werden könnten. Die Auswirkungen dieser Substanzen auf den Knospenaufbruch sollten in späteren Studien mit Sprühapplikationen bei Apfelbäumen validiert werden. Die validierten Substanzen können nach ihrer Zulassung für Apfelanlagen in der Obstbaupraxis angewendet werden.

Die Ergebnisse unserer Studie können wie folgt zusammengefasst werden:

Substanzen, die für ihre dormanzbrechende Wirkung bei Apfel in zukünftigen Feldexperimenten getestet werden können¹ und Substanzen, die für ihren Effekt auf die Verfrühung der Blühzeit getestet werden können²

- Cytokinine (insbesondere iPR, tZ, tZR, tZROG)^{1,2};
- Gibberelline². In unserer Studie haben wir nur GA9, GA15, GA19 und GA53^(1,2) in Apfelknospen identifiziert, deren biologische Aktivität noch unklar ist. In weiteren Studien sollten in erster Linie die biologisch aktiven Gibberelline (GA1, GA3, GA4 und GA7) getestet werden;
- Aminosäuren (Abb. 4, Substanzen 25, 28, 30, 31, 32, 40, 41)^{1,2}.

Substanzen, die für ihre hemmende Wirkung auf den Knospenaufbruch bei Apfel in zukünftigen Feldexperimenten getestet werden können (potentielle Verzögerung der Blühzeit)

- Abscisinsäure;
- Benzoesäure;
- Gibberellinbiosynthesehemmstoffe, wie z.B. Ancymidol, Chlormequat chloride (CCC), Paclobutrazol (PBZ) oder Prohexadione-Calcium usw., wobei die Anwendung in Apfelanlagen in Deutschland von nur dem letztgenannten Stoff zugelassen ist.

6. Danksagung

Die Autoren bedanken sich herzlich bei den QS-Wissenschaftsfonds für die finanzielle Unterstützung des Projektes „Regulierung der Winterruhe bei Apfel im Klimawandel“.

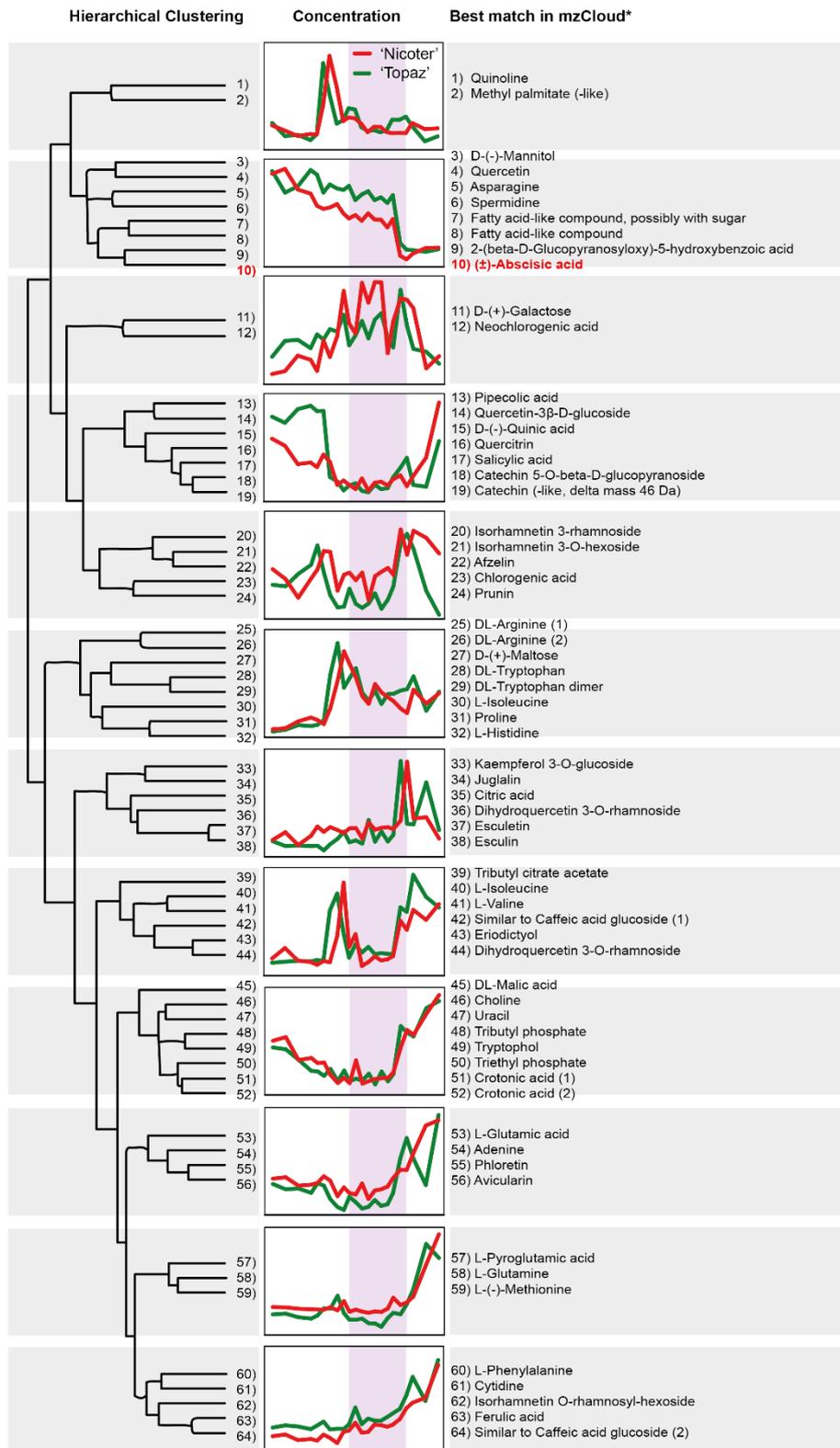


Abbildung 4. Ergebnisse der ungezielten Metabolitendetektion in Apfelknospen von ‚Nicoter‘ und ‚Topaz‘ während der gesamten Dormanzperiode. Der violett markierte Bereich zeigt die Übergangsphase von Endo- zu Ecodormanz. Die hierarchische Clusteranalyse zeigt Ähnlichkeiten der Konzentrationsverläufe einzelner Kandidatensubstanzen, die mithilfe der Datenbank mzCloud bestimmten Metaboliten zugeordnet wurden (mit einer Wahrscheinlichkeit von >85%).

7. Literaturverzeichnis

Allon C. 2020. *Europe's Big Spring Freeze — Arctic Blast to Grip the Continent delivering Sub-Zero Temperatures and Rare April Snow.* <https://electroverse.net/europes-big-spring-freeze-arctic-blast-to-grip-the-continent-delivering-sub-zero-temps-and-rare-april-snow/>.

Bissolli P, Müller-Westermeier G, Polte-Rudolf C. 2007. Aufbereitung und Darstellung phänologischer Daten. *Promet* **33**: 14–19.

Bound SA, Foo E, Gélinas-Marion A, Nichols DS, Nissen R. 2022. The impact of dormancy breakers on hormone profiles, fruit growth and quality in sweet cherry. *Agriculture* **12**: 1–17.

Chang Y-S, Sung F-H. 2000. Effects of gibberellic acid and dormancy-breaking chemicals on flower development of *Rhododendron pulchrum* Sweet and *R. scabrum* Don. *Scientia Horticulturae* **83**: 331–337.

Dalhaus T, Schlenker W, Blanke MM, Bravin E, Finger R. 2020. The Effects of Extreme Weather on Apple Quality. *Scientific Reports* **10**: 1–7.

Drepper B, Bamps B, Gobin A, Van Orshoven J. 2021. Strategies for managing spring frost risks in orchards: effectiveness and conditionality—A systematic review protocol. *Environmental Evidence* **10**: 1–13.

Erez A, Yablowitz Z, Aronovitz A, Hadar A. 2008. Dormancy breaking chemicals; Efficiency with reduced phytotoxicity. *Acta Horticulturae*: 105–112.

FAOSTAT. 2023. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.

Fishman S, Erez A, Couvillon GA. 1987a. The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *Journal of Theoretical Biology* **124**: 473–483.

Fishman S, Erez A, Couvillon GA. 1987b. The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Computer simulation of processes studied under controlled temperatures. *Journal of Theoretical Biology* **126**: 309–321.

Götz K-P, Chmielewski F-M, Tarkowská D, Pěncík A, Novák O. 2023. Phytohormones in Sweet Cherry Buds During Winter Rest and Bud Development. *Journal of Plant Growth Regulation* **42**: 2519–2529.

Hyson DA. 2011. A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *Advances in Nutrition* **2**: 408–420.

Koehler J, Milyaev A. 2022. Apple production and global warming: No winter - no apples? Poster (in German).

Luedeling E, Brown PH. 2011. A global analysis of the comparability of winter chill models for fruit and nut trees. *International Journal of Biometeorology* **55**: 411–421.

Ma H, Zhang Y, Zhang T, He H. 2020. Comparison of allelopathic effects of two typical invasive plants: *Mikania micrantha* and *Ipomoea cairica* in Hainan island. *Scientific Reports*: 1–10.

- Milyaev A, Born U, Sprich E, Hagemann M, Flachowsky H, Luedeling E. eingereichtes Manuskript.** Identifying indicators of apple bud dormancy status by exposure to artificial forcing conditions. *Tree Physiology*.
- Milyaev A, Flachowsky H, Wünsche JN. 2021.** Estimating the timing of endodormancy release in apple by using budbreak forcing conditions. *Acta Horticulturae*: 389–396.
- Milyaev A, Kofler J, Moya YAT, et al. 2022.** Profiling of phytohormones in apple fruit and buds regarding their role as potential regulators of flower bud formation (I Allona, Ed.). *Tree Physiology* **42**: 1–17.
- Saure MC. 1985.** Dormancy release in deciduous fruit trees In: Janick J, ed. *Horticultural Reviews*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 239–300.
- Schopfer P, Bajracharya D, Plachy C. 1979.** Control of Seed Germination by Abscisic Acid: I. Time Course of Action in *Sinapis alba* L. *Plant Physiology* **64**: 822–827.
- Statista. 2023.** <https://de.statista.com/>.
- Statistisches Bundesamt. 2023.** https://www.destatis.de/DE/Home/_inhalt.html.
- Vitasse Y, Rebetez M. 2018.** Unprecedented risk of spring frost damage in Switzerland and Germany in 2017. *Climatic Change* **149**: 233–246.
- Würtz A. 2016.** *Der Frühling aus phänologischer Sicht.* https://www.dwd.de/DE/wetter/thema_des_tages/2016/4/19.html.
- Zhang S, Hu C, Guo Y, Wang X, Meng Y. 2021.** Polyphenols in fermented apple juice: Beneficial effects on human health. *Journal of Functional Foods* **76**: 1–16.
- Zheng C, Halaly T, Acheampong AK, et al. 2015.** Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1527–1542.
- Zhuang W, Gao Z, Wang L, Zhong W, Ni Z, Zhang Z. 2013.** Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA4 in Japanese apricot flower bud dormancy release. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4953–4966.

8. Arbeitspakete des Gesamtprojekts

Arbeitspakete (AP)		Dauer (in Quartalen)							
AP1	1.1 Probenvorbereitung für die Analyse (186 Proben)	■	■						
	1.2 Metabolomics und Analyse von Phytohormonen (Massenspektrometrie)			■	■				
	1.3 Datenauswertung, Statistik, Identifizierung einzelner Moleküle					■	■		
AP2	2.1 Vorbereitung der Veröffentlichungen					■	■	■	■
	2.2 Verbreitung der Ergebnisse					■	■	■	■
	Quartal	3	4	1	2	3	4	1	2
	Projektjahr	2022		2023				2024	