



Universität für Bodenkultur Wien

Untersuchungen zur Pollen- und Kernfertilität verschiedener *Vitis* Sorten

Kristina Heilemann (B. Sc.)

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science

im Rahmen des Studiums Weinbau, Oenologie und Weinwirtschaft

Eingereicht am 10.06.2021

Abteilung Wein- und Obstbau (WOB | H95800)
Department für Nutzpflanzenwissenschaften

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Schmid
Hochschule Geisenheim University
Institut für Rebenzüchtung

Mitbetreuerin: Prof. Dr. Astrid Forneck
Universität für Bodenkultur Wien
Abteilung Wein- und Obstbau



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin/ keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln geahndet wird („Verwendung unerlaubter Hilfsmittel“) und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann.

10.06.2021

Datum

K. Heilemann

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Schmid für die tolle Betreuung der Thesis bedanken. Mein Dank gilt außerdem ganz besonders Frau Dr. Elvira Bleser, die die praktische Betreuung der Versuche übernommen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke, dass Sie immer für alle Fragen ein offenes Ohr hatten.

Auch ohne Frau Vera Pohl wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen, sie hat mir alle praktischen Fähigkeiten bezüglich Pollenuntersuchungen weitergegeben und hat die Technik der Pollenisolation über Jahre perfektioniert. Danke für die großartige Unterstützung und die jederzeit offene Tür.

Für die Kooperation mit Acepo aus den Niederlanden möchte ich mich herzlich bei Frau Iris Heidmann bedanken. Frau Heidmann hat zahlreiche Pollenproben von mir bearbeitet und dies teilweise am Wochenende, vielen Dank für Ihren Einsatz und die Ergebnisse der IFC.

Außerdem möchte ich mich bei den Gärtnern des Instituts für Rebenzüchtung für die Pflege der Topfreben in den Gewächshäusern und im Freiland bedanken.

Ein riesiges Dankeschön gilt außerdem meinem Vater Jürgen Heilemann, der meine gesamte Arbeit Korrektur gelesen hat.

Insgesamt möchte ich mich bei meiner Familie für die großartige Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.

Abstract

Ein früher Austrieb und eine frühe Blüte wie im Jahr 2020 kommen aufgrund des Klimawandels immer häufiger vor. Kalte Temperaturen vor und während der Blüte können die Entwicklung und Reifung der Pollenkörner sowie das Pollenschlauchwachstum und die Befruchtung gefährden. Gleichzeitig haben die ersten sechs Wochen nach Blühbeginn einen wichtigen Einfluss auf die Kernfertilität.

Es wurden Topfreben ab der Blüte für sechs Wochen in Gewächshäusern mit sehr warmen sowie moderaten Temperaturen belassen und jeweils mit Freiland Kontrollen verglichen. Untersucht wurde die phänologische Entwicklung, die Pollenfertilität, reproduktive Parameter sowie die Kernfertilität. Anhand verschiedener Sorten und Klone wurden außerdem verschiedene Methoden und Medien untersucht, die verwendet werden, um die Lebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit der Pollen zu überprüfen.

Zwischen den Temperaturvarianten konnten keine Unterschiede in der Kernfertilität beobachtet werden. Doch die Pollenfertilität wurde bei der Freiland Variante durch Kälteperioden vor und während der Blüte reduziert. Gleichzeitig gab es auch Unterschiede bei den reproduktiven Parametern. Zur Überprüfung der Pollenkeimungsrate *in vitro* stellte sich eine 15%ige Saccharoselösung am geeignetsten dar, da bei Borsäurehaltigen Medien teilweise starke Schwankungen zwischen den Sorten auftraten oder die Pollenkeimungsrate sehr niedrig war.

Die Pollenfertilität ist ein bedeutender Faktor in Bezug auf den Fruchtansatz und den Ertrag. Die hohe Temperatursensitivität ist im Zuge des Klimawandels als kritisch anzusehen, da zu hohe und vor allem zu niedrige Temperaturen die Pollenfertilität reduzieren können. Die Kernfertilität spielt besonders für die Züchtung eine große Rolle. Da die verwendete Arbeitsanleitung des Tetrazolium Tests sich als nicht geeignet herausstellte, ist es für zukünftige Versuche sehr wichtig herauszufinden, wie die Kernfertilität bei *Vitis vinifera* am besten beurteilt werden kann.

Keywords: Blüte, Pollenkeimung, Pollenlebensfähigkeit, Tetrazolium Test, Reproduktive Parameter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blütendiagramm von <i>Vitis</i> . Quelle: (Schenk 1979).....	3
Abbildung 2: Der zweijährige Reproduktionszyklus der Weinrebe. Quelle: (Vasconcelos et al. 2009).....	5
Abbildung 3: Allgemeine Entwicklung einer Samenpflanze: von der Gametenentwicklung bis zur Befruchtung und Embryoentwicklung. Quelle: (Weiler und Nover 2008)	13
Abbildung 4: Anatomie der ventralen Seite (a) und der dorsalen Seite (b) eines ausgereiften Samens. Querschnitt (c) und Längsschnitt (d) durch einen Samen zeigt das Endosperm, die Testa und den Embryo. Quelle: (Ristic und Iland 2005).....	21
Abbildung 5: Reduktion des farblosen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zum rot gefärbten Triphenylformazan in lebenden Zellen. Quelle: (França-Neto und Krzyzanowski 2019)..	27
Abbildung 6: Pollenisolation. v. l. n. r.: Materialien zum Sieben der Pollen. Pollen ist nach dem Sieben auf dem schwarzen Untergrund gut zu erkennen. Zusammenschieben des Pollens auf der Glasplatte mithilfe eines Zellschiebers.....	29
Abbildung 7: Verteilen des Pollens auf dem Keimungsmedium in Petrischalen.....	31
Abbildung 8: Mikroskop-Aufnahme: Anfärbung von Pollen mittels Alexanderlösung. Die lila gefärbten Pollen sind lebend, während das türkise Pollenkorn tot ist.....	32
Abbildung 9: Links unterschiedliche Beerengrößen inklusive grünem, lebenden Fruchtknoten und rechts drei rudimentäre Kerne im Vergleich zu einem normal entwickelten Samen.	34
Abbildung 10: Arbeitsplatz und Arbeitsutensilien, Aufschneiden der Kerne.	36
Abbildung 11: TTC Färbung der Kerne..	38
Abbildung 12: Versuchsaufbau des Topfrebenversuches.	41
Abbildung 13: Austrieb der Topfreben im Gewächshaus und eingernetzte Phönix Trauben im moderaten Gewächshaus.	43
Abbildung 14: Vergleich der Lebensfähigkeit der Pollen in %, ermittelt durch die Methoden der Alexanderfärbung in Geisenheim (Gm) und durch die IFC in den Niederlanden.	45
Abbildung 15: Keimungsrate der Pollen (%) bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen und Rebsorten. Gruppiertes Boxplot mit den drei Sorten Cabernet Sauvignon (CS), Grüner Veltliner (GV) und Syrah (SY) sowie drei verschiedenen Saccharosekonzentrationen.. ...	46

Abbildung 16: Keimungsrate der Pollen (%) bei verschiedenen Keimungsmedien und Rebsorten. Gruppiertes Boxplot mit den drei Sorten Cabernet Sauvignon (CS), Grüner Veltliner (GV) und Syrah (SY) sowie drei verschiedenen Keimungsmedien.....	47
Abbildung 17: Keimungsrate der Pollen in % bei verschiedenen Keimungsmedien. Vergleich <i>in vitro</i> Keimung zweier Borsäurehaltiger Medien (Acepo und Brewbaker) mit einer 15%igen Saccharoselösung.	48
Abbildung 18: Lebensfähige Pollen in %.....	49
Abbildung 19: Gekeimte Pollenkörner in %.	50
Abbildung 20: Anzahl Embryonen pro zehn aufgeschnittene Samen, bzw. pro maximale Anzahl.....	52
Abbildung 21: Phänologische Entwicklung der Mitschurinski Topfreben mit Fokus auf der Blüte der warmen Variante (1) und der Freiland Variante (3).	53
Abbildung 22: Phänologische Entwicklung der Phönix Topfreben mit Fokus auf der Blüte der moderaten Variante (2) und der Freiland Variante (4).....	54
Abbildung 23: Witterungsverlauf im Jahr 2020 in Gm. Wetterstation der Hochschule. Quelle: (Baus und Ehlig 2021)	55
Abbildung 24: Temperaturverlauf im moderaten Gewächshaus. Aufzeichnung mittels PeaktTech Datenlogger Modell 5185. Blüteperiode der Phönix Topfreben T2.1 bis T2.4. 56	
Abbildung 25: Temperaturverlauf im warmen Gewächshaus. Aufzeichnung mittels PeaktTech Datenlogger Modell 5185. Blüteperiode der Mitschurinski Topfreben	55
Abbildung 26: Lebensfähigkeit der Pollen der Sorte Mitschurinski in %.....	57
Abbildung 27: Lebensfähigkeit der Pollen der Sorte Phönix in %.....	58
Abbildung 28: Keimungsrate Pollen in %. Variante 1 = warm, Variante 3 = Freiland	59
Abbildung 29: Keimungsrate Pollen in %. Variante 2 = moderat, Variante 4 = Freiland ..	60
Abbildung 30: Anzahl Embryonen pro zehn aufgeschnittene Samen. Variante 1 = warm, Variante 3 = Freiland, Michu_JKI = Kontrolle vom JKI	64
Abbildung 31: Anzahl Embryonen pro zehn aufgeschnittene Samen, bzw. pro maximale Anzahl. Variante 2 = moderat, Variante 4 = Freiland	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schema zur Beurteilung der TTC Färbung. Modifiziert nach Evaluierungs- Beispielen von (Leist und Krämer 2003)	37
Tabelle 2: Untersuchte Spätburgunder Klone und Sorten. Standort am Institut für Rebenzüchtung der Hochschule Geisenheim sowie die verwendete Abkürzung.....	39
Tabelle 3: Nummerierung der Topfreben und Zuweisung der jeweiligen Temperaturvariante und Sorte. T steht für Topfrebe.	42
Tabelle 4: Unterschiede in den reproduktiven Parametern von drei verschiedenen Pinot Noir Klonen.	51
Tabelle 5: Untersuchte reproduktive Parameter der Sorte Mitschurinski.	61
Tabelle 6: Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 3.....	61
Tabelle 7: Untersuchte reproduktive Parameter der Sorte Phönix..	62
Tabelle 8: Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten 2 und 4.....	63

Abkürzungen

BBCH	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und Chemische Industrie
ES	Entwicklungsstadium
Gm	Geisenheim (Hessen)
IFC	Impedance Flow Cytometer (Durchflusszytometer)
JKI	Julius-Kühn-Institut
L	Liter
ml	Mililiter
mmol	Milimol
n.t.	nicht getestet
<i>V. vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TZ	Tetrazolium
μl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturüberblick.....	3
2.1	<i>Blüte</i>	3
2.1.1	Anatomie	3
2.1.2	Blütenentwicklung.....	5
2.1.3	Ablauf Blüte	8
2.2	<i>Pollen.....</i>	12
2.2.1	Pollenaufbau und Entwicklung	12
2.2.2	Pollenlebensfähigkeit und Pollenkeimungsfähigkeit.....	14
2.2.3	Alexanderlösung	16
2.2.4	Durchflusszytometer	16
2.3	<i>Fruchtansatz.....</i>	18
2.4	<i>Der Samen</i>	20
2.4.1	Samen Anatomie und Morphologie	20
2.4.2	Entwicklung	22
2.4.3	Samen Vitalität	25
3	Material und Methoden	29
3.1	<i>Techniken zur Pollenisolation.....</i>	29
3.2	<i>Untersuchungen zur Pollenlebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit</i>	30
3.2.1	Untersuchung Pollenkeimungsfähigkeit mittels Keimungsmedien	30
3.2.2	Untersuchung Pollenlebensfähigkeit mittels Alexanderlösung.....	31
3.2.3	IFC Analyse – Kooperation mit Acepo	33
3.3	<i>Untersuchungen an Beeren und Samen</i>	34
3.3.1	Reproduktive Parameter	34
3.3.2	Schwimmprobe.....	35
3.3.3	Tetrazolium Test	36
3.4	<i>Sorten Pollenuntersuchungen und Kernuntersuchungen</i>	38
3.5	<i>Topfribenversuch.....</i>	39
3.5.1	Aufbau	39
3.5.2	Erfasste Parameter	43

3.5.3	Bonitur der Phänologie.....	44
3.6	<i>Statistische Analyse</i>	44
4	Ergebnisse	45
4.1	<i>Sortenversuch</i>	45
4.1.1	Pollenlebensfähigkeit	45
4.1.2	Pollenkeimungsfähigkeit	46
4.2	<i>Vergleich der Pinot Noir Klone</i>	49
4.2.1	Vergleich von Lebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit	49
4.2.2	Vergleich der reproduktiven Parameter.....	51
4.2.3	Tetrazolium Test	52
4.3	<i>Topfribenversuch</i>	53
4.3.1	Phänologische Entwicklung	53
4.3.2	Witterungsverlauf im Freiland und Temperaturverlauf im Gewächshaus	55
4.3.3	Pollenlebensfähigkeit	57
4.3.4	Pollenkeimungsrate.....	59
4.3.5	Reproduktive Parameter	61
4.3.6	Tetrazolium Test	64
5	Diskussion	66
5.1	<i>Sortenversuch</i>	66
5.1.1	Pollenlebensfähigkeit	66
5.1.2	Pollenkeimungsfähigkeit	67
5.2	<i>Vergleich der Pinot Noir Klone</i>	69
5.3	<i>Topfribenversuch</i>	70
5.3.1	Phänologische Entwicklung	70
5.3.2	Pollenlebensfähigkeit	71
5.3.3	Pollenkeimungsfähigkeit	72
5.3.4	Reproduktive Parameter	74
5.3.5	Tetrazolium Test	77
	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	81
7	Anhang	87

1 Einleitung

Der Weinbau steht vor neuen Herausforderungen. Jede Vegetationsperiode bringt neue Besonderheiten mit sich, kein Jahr gleicht dem anderen. So waren die Wintermonate und das Frühjahr 2020 häufig wärmer als im Mittel, was zu einem frühen Austrieb und einer frühen Blüte führte. Gleichzeitig folgte auf den Beginn der Blüte eine Periode, die kälter als das Mittel war (Baus und Ehlig 2021). Besonders die Blüte stellt eine sehr kritische Periode dar, die sehr anfällig für Temperaturschwankungen ist. Vor allem die Pollenkeimung wird maßgeblich durch die Temperatur bestimmt (Vasconcelos et al. 2009). Der Pollen ist allgemein sehr anfällig gegenüber Temperaturstress, auch während seiner Entwicklung und Reifung (Luria et al. 2019). Die Lebensfähigkeit der Pollen ist sortenabhängig, doch auch die Witterung hat einen großen Einfluss (May 2004). Zwischen der Pollenlebensfähigkeit und der Keimungsfähigkeit der Pollen gibt es einen engen Zusammenhang, aufgrund dessen sind diese zwei Faktoren maßgeblich für eine erfolgreiche Befruchtung und damit einen hohen Fruchtansatz (Baby et al. 2016). Die Lebensfähigkeit und die Keimungsfähigkeit der Pollen werden als Pollenfertilität zusammengefasst.

Für die Züchter spielt außerdem ein anderer großer Faktor, die Kernfertilität, eine große Rolle. Im Institut für Rebenzüchtung an der Hochschule Geisenheim wurde in den letzten Jahren eine immer größer werdende Zahl an nicht keimenden Samen beobachtet. Die Keimfähigkeit ist zum einen genetisch bedingt, doch zum anderen unterliegt sie auch Jahrgangsschwankungen (Lott 1969). LOTT (1969) stellte fest, dass die Temperatur während der ersten sechs Wochen nach dem Blühbeginn einen maßgeblichen Einfluss auf die Keimfähigkeit der Samen hat. In dieser Zeit scheint die Samenentwicklung, insbesondere die Embryoentwicklung, sehr sensibel auf die Temperatur zu reagieren.

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit drei Themenkomplexe behandelt. Zum einen wurden zwei Methoden zur Untersuchung der Pollenlebensfähigkeit untersucht sowie gängige Keimungsmedien zur Überprüfung der Pollenkeimungsfähigkeit. Dies geschah anhand verschiedener Rebsorten. Ziel dabei war es für zukünftige Untersuchungen das beste Keimungsmedium für Pollen von *Vitis vinifera* herauszufiltern. Gleichzeitig wurde eine gängige Methode zur Überprüfung der Lebensfähigkeit der Pollen mit einer neuen Methode verglichen.

Zum anderen wurde anhand verschiedener Spätburgunder Klone die Frage gestellt, ob diese sich in ihrer Pollenvitalität unterscheiden, was zu der unterschiedlichen Traubenstruktur der Klone führt. Hierfür wurden die Ergebnisse vorangegangener Pollenkeimungsversuche verwendet und das vielversprechendste Medium genutzt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die oben genannte Hypothese von LOTT (1969) zu überprüfen, da es keine vergleichbaren und aktuellen Versuche zu dieser Thematik gibt. Dafür wurden Topfreben während der Blüte und den ersten sechs Wochen danach, in Gewächshäusern mit unterschiedlichen Temperaturen beobachtet und mit Freilandkontrollen verglichen. Damit sollte der Einfluss der Temperatur auf den Verlauf der Blüte, die Pollenvitalität, auf verschiedene reproduktive Parameter und die Kernfertilität untersucht werden. Die Kernfertilität wurde anhand des Tetrazolium Tests beurteilt. Diese Methode wurde für *Vitis vinifera* Samen noch nicht oft durchgeführt und stellt damit einen neuen Aspekt dar.

2 Literaturüberblick

2.1 Blüte

2.1.1 Anatomie

Die Blüte der Rebe setzt sich zusammen aus je fünf Kelchblättern, Kronblättern und Staubblättern und dem Fruchtknoten, bestehend aus zwei Fruchtblättern. Die Anordnung erfolgt von außen nach innen gehend in konzentrischen Kreisen (vgl. Abb. 1). Die fünf Kelchblätter formen den Kelch am Boden der Blüte und schützen in der frühen Entwicklung den Rest der Blüte. Die fünf Kronblätter dienen dem Schutz der reproduktiven Organe. Sie sind an der Epidermis zusammengewachsen und formen das sogenannte Käppchen, auch Kalyptra genannt (Vasconcelos et al. 2009).

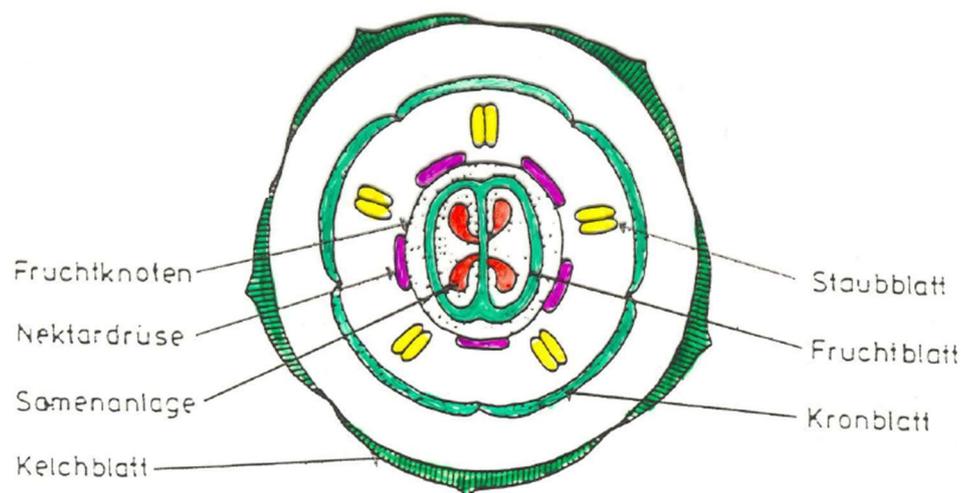


Abbildung 1: Blütendiagramm von *Vitis*. Quelle: (Schenk 1979)

Das Androeceum, das männliche Geschlechtsorgan, umfasst fünf Staubblätter mit jeweils einem langen Staubfaden, an dessen Ende eine Anthere mit vier Pollensäcken sitzt (Vasconcelos et al. 2009). Die Antheren sind charakteristisch für Angiospermen, durch längliche Schlitze werden die Pollen entlassen (Gerrath et al. 2015). Die Staubblätter sterben nach der Bestäubung ab (Keller 2010). Die Zellwand der Antheren besteht aus insgesamt drei unterschiedlichen Geweben. Es handelt sich um eine äußere Epidermis, das Endothecium und das Tapetum. Letzteres dient der Ernährung der Mikrosporen, welche

durch Meiose in der Pollenmutterzelle entstehen. Platzen die Staubbeutel auf, löst sich das Endothecium und wandert zum Zentrum der Anthere (Vasconcelos et al. 2009).

Das Gynoeceum, das weibliche Geschlechtsorgan, besteht aus Narbe, Fruchtknoten und Griffel (Gerrath et al. 2015). Die Epidermis der Narbe führt als Leitgewebe in den Kanal des Griffels. Zu Beginn der Blüte bedeckt eine Zuckerlösung die Narbe, welche durch das Leitgewebe produziert wird (Pratt 1971). Der Fruchtknoten sitzt am unteren Ende des Griffels und besteht aus zwei Kompartimenten. In jedem von ihnen sitzen jeweils zwei Samenanlagen. Die Samenanlagen sind durch das Septum getrennt. Bei der Befruchtung wächst der Pollenschlauch durch das Septum, den inneren Kanal des Griffels. Jede Samenanlage besitzt einen Embryosack mit einer haploiden Eizelle sowie einem diploiden Embryosackkern. Der Fruchtknoten schützt die sich darin befindenden Samenanlagen vor Austrocknung und mechanischen Verletzungen (Vasconcelos et al. 2009). Pro Fruchtknoten befinden sich meist vier Samenanlagen, deren Anzahl kann jedoch nach CURRLE ET AL. (1983) variabel sein und bis zu fünf Anlagen enthalten. Die Samenanlagen werden aus dem Bildungsgewebe der Fruchtblätter gebildet, der Plazenta. Durch den Funiculus bleiben sie mit der Plazenta verbunden. Am unteren Ende der Samenanlagen sitzt eine Öffnung, die Mikropyle (Weiler und Nover 2008). Der Pollenschlauch wächst durch die Mikropyle in die Samenanlage und kann dann im Embryosack die Befruchtung vollziehen (vgl. Abb. 3) (May 2004).

Die Samenanlagen werden etwa zwei Wochen vor Beginn der Blüte gebildet (Keller 2010). In der Embryosackmutterzelle findet die Meiose statt, drei der vier entstandenen Makrosporen degenerieren. Die Makrospore entwickelt sich dann zur sogenannten Embryosackzelle. Durch drei Kernteilungsschritte entstehen insgesamt acht Kerne im Embryosack (Kassemeyer und Staudt 1981). Am unteren Pol der Mikropyle bilden die Eizelle und die zwei Synergiden den Eiapparat. Drei Antipoden befinden sich am entgegengesetzten Ende. Der diploide Embryosackkern entwickelt sich nun durch das Verschmelzen der beiden zentralen Kerne (vgl. Abb. 3). Am Ende dieser Entwicklung sind die Samenanlagen schließlich befruchtungsreif (Weiler und Nover 2008). Das Verschmelzen der beiden Polkerne in der Mitte des Embryosacks findet etwa einen Tag vor dem Aufblühen statt (Kassemeyer und Staudt 1981). Der programmierte Zelltod der Synergiden hat die Funktion, dass nach Eindringen des Pollenschlauchs in die Eianlagen, das weitere Pollenschlauchwachstum gehemmt wird und die Spermazellen freigesetzt werden können.

Außerdem hemmen sie die Annäherung von anderen Pollenschläuchen (Weiler und Nover 2008).

Der Großteil der *Vitis vinifera* (*V. vinifera*) Sorten sind Zwitter, deren Blüten sowohl fertile Stempel als auch fertile Staubblätter besitzen. Andere Arten der Gattung *Vitis* haben weibliche Blüten mit einem fertilen Stempel, deren Staubblätter aber zurückgebildet sind und deren Pollen nicht fertil sind (Pratt 1971). Weibliche Blüten kommen z.B. bei der Wildform *Vitis riparia* vor, die infertilen Pollen besitzen keine Keimporen und können somit nicht auskeimen (Gerrath et al. 2015). Nur wenige *V. vinifera* Kultursorten haben eine weibliche Blüte, wie z.B. Maccabéo, Picolit und Moscato rosa (Vasconcelos et al. 2009). Männliche Blüten haben funktionale, aufrechte Staubblätter, doch der Stempel ist weitestgehend abgestorben (Pratt 1971).

2.1.2 Blütenentwicklung

Der zweijährige Zyklus zur Blüten- und Fruchtbildung ist charakteristisch für mehrjährige, verholzende Pflanzen, so auch für die *Vitis* Arten (vgl. Abb. 2) (Keller 2010).

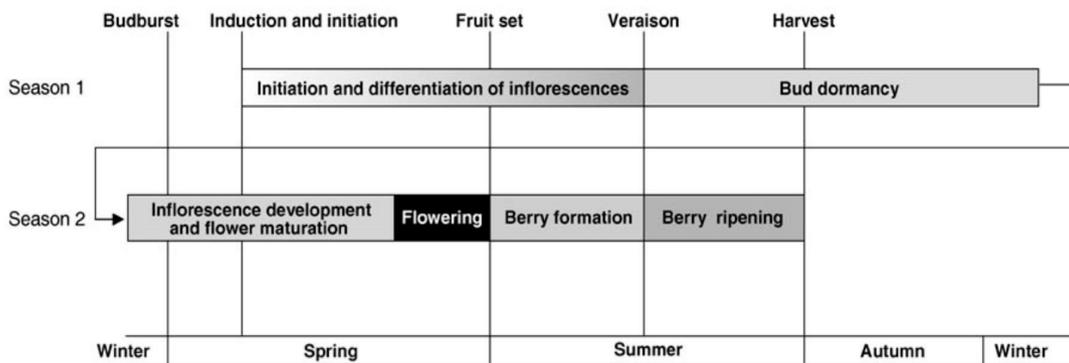


Abbildung 2: Der zweijährige Reproduktionszyklus der Weinrebe. Quelle: (Vasconcelos et al. 2009)

Die Blütenentwicklung erfolgt in drei Hauptphasen. Die erste Phase umfasst die Bildung der Anlagen, während sich in der zweiten Phase sich diese Anlagen zu Infloreszenz-Primordien ausdifferenzieren. Im letzten Schritt werden schließlich die Einzelblüten gebildet (Vasconcelos et al. 2009).

Die Anlagen werden in den Axillarknospen gebildet, die sich in den Blattachsen befinden. Dies geschieht zu Beginn der Vegetation des ersten Jahres, also ca. 15 Monate bevor die aus

diesen Anlagen resultierenden Trauben geerntet werden. Die undifferenzierten Anlagen lassen sich zunächst nicht von denen der Ranken unterscheiden, sie können sich sowohl in Infloreszenz-Primordien als auch in Ranken-Primordien entwickeln. MAY (2004) beobachtete auch Übergangsformen von beiden. Ranke und Geschein haben also entwicklungs-genetisch denselben Ursprung (Currle et al. 1983). Der Beginn der Entwicklung der Anlagen ist sortenabhängig, in Deutschland beginnt sie bei Riesling fünf bis sieben Wochen nach Knospenaufbruch. Die zweite Phase, die Bildung der Infloreszenz-Primordien, beginnt damit, dass sich ein Hüllblatt bildet. Dann teilt sich die Anlage in zwei Arme auf (Vasconcelos et al. 2009). Der Hauptast streckt sich, während der erste Verzweigungsast sich nicht weiterentwickelt, hieraus entsteht der basale Rispenast (Currle et al. 1983). Die Anlage verästelt sich zunehmend, wobei der Grad der Verästelung akropetal abnimmt, was dem Infloreszenz-Primordium die typische, konische Form gibt. Sind schließlich ein bis drei Infloreszenz-Primordien gebildet, tritt die Knospenruhe ein. Die Anzahl der Einzelblüten ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht festgelegt (May 2000).

Mit dem Anschwellen der Knospen im zweiten Jahr beginnt die Bildung der Organe der Einzelblüten in folgender Reihenfolge: Kelchblatt, Kronblatt, Staubblatt, Fruchtblatt, Samenanlagen (May 2000).

Einflussfaktoren 1.Jahr

Die Anzahl der Infloreszenzen wird sowohl durch Umwelteinflüsse als auch durch die genetische Veranlagung der Sorten beeinflusst. So gilt z.B. Riesling als fertil, Gutedel als weniger fertil und Weißburgunder als sehr wenig fertile Sorte. Im Durchschnitt werden pro Trieb ein bis zwei Gescheinsanlagen gebildet, maximal jedoch vier (Currle et al. 1983). Ein weiterer Einflussfaktor ist die Knospenfertilität, welche abhängig von der Insertionshöhe am Trieb ist. Von der Triebbasis zur Mitte des Triebs nimmt die Fertilität zu, während sie dann zur Triebspitze hin wieder abnimmt (Vasconcelos et al. 2009). Grund dafür ist, dass die Knospen sich an einem Trieb aufgrund von Nährstoffkonkurrenz gegenseitig hemmen. Vor allem an der Triebbasis treiben oft 30-60% der Knospen nicht aus, an der Triebspitze bis zu 20% (Currle et al. 1983).

Es besteht außerdem eine positive Korrelation zwischen der durchschnittlichen Lufttemperatur und dem Anteil der fruchttragenden Triebe. Besonders die Temperaturen in

der Periode von Mitte Juni bis Mitte Juli scheinen einen Effekt auf die Anzahl der Infloreszenzen im nächsten Jahr zu haben. Vor allem für die Anlage der zweiten und dritten Infloreszenz an einem Trieb scheint eine hohe Temperatur von großer Bedeutung zu sein (Srinivasan und Mullins 1981). Hohe Temperaturen zwischen 20°C und 30°C begünstigen die Infloreszenzbildung (Currel et al. 1983). Temperaturen unter 20°C begünstigen jedoch die Ausbildung von Ranken (Vasconcelos et al. 2009).

Ob sich eine Anlage zum Ranken-Primodium oder Infloreszenz-Primodium ausdifferenziert, hängt außerdem stark mit den Strahlungsbedingungen zusammen (Gerrath et al. 2015). So sind oft Knospen, die sich innerhalb der Laubwand befinden, aufgrund der geringeren Lichteinstrahlung weniger fruchtbar (Srinivasan und Mullins 1981).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Ausdifferenzierung der Anlagen ist das Verhältnis von Cytokininen zu Gibberellinsäure (Currel et al. 1983). Der Einfluss von Gibberellinen hängt vom Zeitpunkt der Entwicklung ab. Die Bildung von Anlagen und die Verzweigung dieser in zwei Arme benötigt Gibberelline. Im weiteren Verlauf inhibieren Gibberelline jedoch die Blütenbildung, da sie die Entwicklung der Anlagen hin zur Ranke fördern. Cytokinine spielt eine wichtige Rolle bei der Blütenbildung. Während des Knospenaufbruchs und der Blüte enthält der Xylemsaft eine hohe Konzentration an Cytokininen, die von den Wurzeln gebildet werden (Vasconcelos et al. 2009). Umwelteinflüsse wie hohe Temperaturen, ausreichender Wassergehalt des Bodens, optimaler Makronährstoffgehalt und hohe Lichteinstrahlung fördern die Biosynthese der Cytokinine (Srinivasan und Mullins 1981). GERRATH ET AL. (2015) wiesen nach, dass sich eine Anlage unter schlechten Lichtbedingungen, kühlen Temperaturen und Anwesenheit von Gibberellinsäure zur Ranke differenziert. Bei umgekehrten Gegebenheiten und hohen Cytokinin Konzentrationen, differenziert sich die Anlage zur Infloreszenz (Gerrath et al. 2015).

Einflussfaktoren 2.Jahr

Auch in der dritten Phase während der Blüteninitiation, spielen Licht und Temperatur eine große Rolle. Ist die Temperatur während des Knospenaufbruchs im zweiten Jahr sehr hoch, resultiert dies in einer geringeren Anzahl von Einzelblüten pro Infloreszenz. Die Temperatur während dieser Zeit scheint außerdem Einfluss auf die Größe der Einzelblüten zu haben (Vasconcelos et al. 2009). Temperaturen um die 12°C wirken sich günstig auf die Anzahl

der Einzelblüten aus (May 2004). Eine optimale Versorgung mit den Mineralstoffen Stickstoff, Kalium und Phosphor fördert eine hohe Cytokinin Produktion in den Wurzeln, welche wichtig für die Differenzierung der Blüten sind (Srinivasan und Mullins 1981). Auch die Reservestoffeinlagerung hat Einfluss auf die Zahl der Einzelblüten (Lebon et al. 2008).

2.1.3 Ablauf Blüte

Etwa fünf bis zehn Wochen nach Knospenaufbruch und zwei Wochen nachdem die Samenanlagen gebildet wurden, beginnt die Blüte. Der Beginn der Blüte wird oft als Anthese bezeichnet, womit das Abwerfen der Käppchen und damit das Freilegen der männlichen und weiblichen Blütenorgane gemeint ist (Keller 2010). An einem Trieb mit mehreren Gescheinen beginnt das basipetale Geschein mit der Blüte etwa zwei bis drei Tage früher als die distalen Infloreszenzen (May 2004).

Im Gegensatz zu den meisten Pflanzen sind die Kronblätter der Rebe an der Spitze zusammengewachsen. Mit dem Ablösen des Käppchens entlassen die Staubbeutel den Pollen. Das Abwerfen des Käppchens geschieht vor allem in den frühen Morgenstunden, wenn die Temperaturen ansteigen (Currle et al. 1983). Dieser Prozess findet folgendermaßen statt: am basalen Teil der Kronblätter bildet sich das Abszissions Gewebe, zunächst an einem Kronblatt und verbreitet sich über die benachbarten Kronblätter weiter. Gleichzeitig verfärbt sich das Käppchen matt grün-gelb. Am Tag des Blütebeginns bildet sich eine Spannung zwischen der äußeren, trockenen Zellschicht und der inneren, turgeszenten Zellschicht aus. Dadurch löst sich zunächst nur ein Kronblatt, in 20-30 Sekunden Intervallen lösen sich nacheinander alle Kronblätter ab und das Käppchen wird abgelöst. Die Reblüte folgt einem bestimmten Tagesrhythmus. Sie beginnt am Morgen zwischen sechs und acht Uhr, bis zehn Uhr nimmt die Geschwindigkeit der sich öffnenden Blüten zu. Mittags kommt es zu einer Stagnation, dann öffnen sich noch einmal einige Blüten zwischen 15 und 16 Uhr. Nachts findet kein weiteres Aufblühen statt (Vasconcelos et al. 2009).

Jede Anthere produziert mindestens 4000 Pollenkörner, bei fünf Antheren pro Blüte ergeben sich bis zu 20.000 Pollenkörner pro Blüte. Antheren, die keinen Pollen produzieren, erscheinen weiß und nicht im satten gelb (May 2004). Nach dem Käppchen Abwurf dehydrieren die Antherenwände, woraufhin sich die Pollensäcke öffnen und der Pollen verbreitet wird. Die Verbreitung des Pollens dauert zwischen einer Minute und einer Stunde (Vasconcelos et al. 2009). Abhängig ist die Dauer von der Witterung, bei feuchtem Wetter

dauert es länger, als bei trockenen Gegebenheiten (May 2004). Nach der Verbreitung ist der Pollen nur einige Tage lebensfähig (Vasconcelos et al. 2009).

Bestäubung

Als Bestäubung wird der Vorgang bezeichnet, wenn die Pollenkörner auf der Narbe landen. Ist das Pollenkorn gelandet, kann es auskeimen und einen Pollenschlauch bilden (May 2004).

Allgemein lässt sich die Bestäubung in vier Phasen einteilen. Die erste Phase ist die der Erkennung durch die Narbe und das Anheften des Pollens. Erfolgt eine positive Erkennung, findet eine Umstrukturierung der Pollenhülle statt, wodurch der Pollen Wasser aus der Narbe aufnehmen kann und somit rehydriert wird. Der zweite Schritt ist die Keimung, dabei tritt die Spitze des Pollenschlauchs hervor. Es erfolgt eine wechselseitige Stimulation, d.h. das keimender Pollen die Keimung von daneben liegenden Pollenkörnern induziert. Somit können sich die Pollenschläuche zeitgleich entwickeln. Die dritte Phase umfasst das Pollenschlauchwachstum. In der vierten und abschließenden Phase ändert der Pollenschlauch seine Richtung im Bereich der Eianlagen und wächst über den Funiculus zur Mikropyle (Weiler und Nover 2008).

Die Narbe hat die Aufgabe den Pollen festzuhalten und eine Oberfläche zu bieten, auf der er keimen kann. Dies geschieht durch ein Sekret, welches hauptsächlich aus Glucose und Fructose besteht. Weitere Bestandteile sind Lipide, phenolische Substanzen und Polysaccharide (May 2004).

Die Bestäubung durch Insekten spielt bei der Rebe keine Rolle, da sie keine bevorzugten Wirte für Bienen sind. Trotzdem konnte in Deutschland festgestellt werden, dass 69 von 70 Pollenproben von Bienen, die im Weinberg starben, Rebenpollen enthielten. Die dominierende Bestäubungsform bei *V. vinifera* ist die der Selbstbestäubung. Die Möglichkeit ist weitaus größer, dass Pollen derselben Blüte oder einer benachbarten Blüte den Weg zur Narbe findet, als dass eine Fremdbestäubung stattfindet. Oft findet die Bestäubung schon statt, bevor die Käppchen abgeworfen wurden, die sogenannte Kleistogamie. Die Kleistogamie scheint genetisch bedingt, da dies bei manchen Rebsorten öfter vorkommt, als bei anderen. Außerdem kommt sie häufiger gegen Ende der Blüte vor

(May 2004). Fremdbestäubung ist dennoch möglich und resultiert oft in einem besseren Samenansatz in den Beeren (Vasconcelos et al. 2009).

Pollenschlauchwachstum und Befruchtung

Beim Pollenschlauchwachstum verlängert sich die Pollenzelle mit einer Geschwindigkeit von $0,3\text{mm h}^{-1}$ um das 1000-fache. Die Geschwindigkeit ist ein entscheidender Faktor für die Befruchtung, da die Samenanlagen nur für gewisse Zeit nach der Blütenöffnung empfänglich sind. Nach Ablauf dieser Zeit können sie nicht mehr befruchtet werden. In der Blüte legt der Pollenschlauch eine Strecke von 2mm zurück. Das Pollenschlauchwachstum ist ein Prozess, der viel Energie kostet, die wachsenden Pollenschläuche haben eine hohe Atmungsaktivität, welche durch den Abbau von Stärkereserven gewährleistet wird. Stärke wurde vor der Blütenöffnung in die Pollenkörner importiert und akkumuliert (Keller 2010).

Wenn der Keimungsschlauch durch den Griffel hin zu den Samenanlagen wächst, teilt sich die generative Zelle durch diesen Stimulus in zwei Spermazellen. Erreicht der Pollenschlauch die Samenanlagen, verschmilzt eine Spermazelle mit der Eizelle und befruchtet diese. Die zweite Spermazelle verschmilzt mit den beiden Kernen des Embryosacks zum Endosperm. Die befruchtete Eizelle entwickelt sich zum Embryo. Es dauert ungefähr zwei bis drei Tage, ab dem Zeitpunkt der Pollenlandung auf der Narbe, bis die Befruchtung vollständig abgeschlossen ist (Vasconcelos et al. 2009).

Da jede Blüte vier Samenanlagen besitzt, kann jede Beere maximal vier Samen entwickeln. Jeder Samen ist dabei das Ergebnis der Befruchtung von einem anderen Pollenkorn (Vasconcelos et al. 2009). Nach der Befruchtung trocknen Narbe und Griffel ein und bleiben als schwarze Narbe am polaren Ende der jungen Beeren zurück (May 2004). Es kann vorkommen, dass Blüten zwar bestäubt werden, die Befruchtung jedoch unterbleibt. Diese Blüten entwickeln sich zu kleinen, grünen Fruchtknoten. Erst die Befruchtung führt dazu, dass sich aus dem Fruchtknoten Beerenhaut- und fleisch entwickeln (Vasconcelos et al. 2009).

Einflussfaktoren auf den Erfolg der Blüte

Die Blüteperiode der Rebe wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, ein wesentlicher Einflussfaktor ist dabei die Temperatur.

Die optimale Temperatur während der Blüte hängt von der Sorte und dem Weinanbaugebiet ab, doch generell sind warme Temperaturen zwischen 20 und 30°C förderlich für einen positiven Verlauf der Blüte (Vasconcelos et al. 2009). Unter guten Witterungsbedingungen dauert die Blüte acht bis zehn Tage (Currle et al. 1983). Durchschnittliche Temperaturen, die unter 15°C oder über 32°C liegen, wirken sich schädlich auf Bestäubung und Befruchtung aus (Dry et al. 2010). Für das Aufplatzen der Staubbeutel ist es wichtig, dass es warm und auch trocken ist. Problematisch wird es jedoch, wenn es sehr trocken und windig ist, da dann die Narbe austrocknet und der Pollen nicht haften bleibt (Vasconcelos et al. 2009).

Der Pollen vieler Arten ist sehr anfällig gegenüber Temperaturstress während der Mikrosporogenese, der Pollenreifung und der Befruchtung (Luria et al. 2019). Auch das Pollenschlauchwachstum hängt von der Temperatur ab. Bei 25-30°C kann die Befruchtung schon nach 12h stattfinden, bei 20°C nach 24h. Bei 15°C kann es 48h dauern, bis die Befruchtung erfolgt ist. Sinken die Temperaturen noch weiter, kann es passieren, dass die Pollenschläuche die Samenanlagen zu spät erreichen, oder sie das Wachstum schon vorher einstellen (Keller 2010). Die Folgen von tiefen Temperaturen hängen oft von der Dauer der Kälteperiode ab. Kurze Kälteperioden von 10°C beeinflussen das Pollenschlauchwachstum nicht, vorausgesetzt, dass danach wieder warme Temperaturen vorherrschen. Beträgt die Temperatur jedoch dauerhaft 10°C, kann die Befruchtung unterbleiben, da die Geschwindigkeit des Pollenschlauchwachstums zu niedrig ist (Staudt 1982). Bei 28°C wurde eine maximale Geschwindigkeit des Pollenschlauchwachstums von 10,7 µm/min festgestellt (Staudt 1982). Die hohen Temperaturen gewährleisten somit, dass der Pollenschlauch möglichst schnell wächst und die Micropyle erreichen kann (Vasconcelos et al. 2009).

Eine nasse Witterung hat ebenfalls Einfluss auf die Blüte. Bei Niederschlag löst sich das Käppchen schlechter ab und es kommt zu einer geringeren Bestäubungsrate. Außerdem kann Pollen abgewaschen werden, oder Pollenkörner haften aneinander. Je ungünstiger die

Witterungsbedingungen während der Blüte sind, desto länger zieht sich die Blüte hin. In sehr regenreichen Regionen, wie z.B. im Minho in Portugal, kann die Blüte bis zu 32 Tage dauern (Vasconcelos et al. 2009).

Wenn bei schlechten Witterungsbedingungen eine schnelle Befruchtung durch das verzögerte Pollenschlauchwachstum verhindert wird, ist der Versorgungsgrad der Rebe mit Bor von Bedeutung (May 2004). So konnte MAY (2004) *in vitro* die Notwendigkeit von Bor für die Pollenkeimung nachweisen.

Ein weiterer Einflussfaktor ist die Verfügbarkeit von Assimilaten zu bestimmten Zeitpunkten. Während der Meiose sind die Antheren und Samenanlagen sehr anfällig für Stress, vor allem eine geringe Zuckerzufuhr in dieser Phase kann dann zum Abstoßen von Blüten führen. Die Zuckerzufuhr wird durch Mobilisierung der Reservestoffe sowie durch die Fotosynthese gewährleistet (Lebon et al. 2008). Die Kohlenhydratversorgung in den Blüten wird von Umweltfaktoren wie Trockenstress oder Hitze beeinflusst, was zur teilweisen oder ganzen Sterilität führen kann. Auch die Stärkekonzentration in den Samenanlagen während spezifischer Entwicklungsschritte steht in einem engen Zusammenhang mit der Fertilität (Lebon et al. 2005). Blüten, die erst später aufblühen, könnten insofern einen Nachteil haben, dass sie weniger Kohlenhydrate zur Verfügung haben (Friend et al. 2009).

2.2 Pollen

2.2.1 Pollenaufbau und Entwicklung

Meist haben Pollenkörner eine elliptische bis kugelige Form, was jedoch innerhalb der Sorten variieren kann (May 2004; Currle et al. 1983). Pollenkörner sind zwischen 25 und 30 μm lang und zwischen 12 und 15 μm breit (Vasconcelos et al. 2009). An der äußeren Zellwand besitzen sie drei längliche Furchen, von denen jede eine Keimpore hat, durch die der Pollenschlauch wachsen kann (Gerrath et al. 2015). Pollenkörner sind von einer dünnen Cellulose- und Pektinzellwand umgeben, der Intine. Darauf lagert eine Schutzschicht aus Sporopollenin, die Exine. Diese schützt den Pollen gegen Umwelteinflüsse, wie Schäden durch UV-Licht oder Austrocknung (Weiler und Nover 2008). Zum Schutz vor UV-Licht enthält die Zellwand der Pollen außerdem viele phenolische Verbindungen (Keller 2010). TELLO ET AL. (2018) zeigten, dass sehr hohe Temperaturen, wie z.B. 42°C für vier Stunden bereits den Aufbau der äußeren Zellwand des Pollenkorns gefährden können.

In der Epidermis, im Endothecium und im Tapetum der Anthere ist Stärke eingelagert. Durch die Konzentration der Stärke in diesen Geweben wird beeinflusst, wie viel Zucker das Pollenkorn während seiner Entwicklung zur Verfügung hat (Lebon et al. 2005). Die Stärkereserven in den Antheren sind vom Genotyp abhängig und haben damit einen Einfluss auf den Erhalt von reifen Pollenkörnern zu Blühbeginn (Tello et al. 2018).

Entwicklung und Reifung des Pollenkorns

Sobald die Infloreszenzen klar sichtbar sind, können in den Antheren Sporenmutterzellen beobachtet werden (Tello et al. 2018). Der Zellkern der Pollenmutterzelle unterläuft zunächst die Meiose ca. zwei Wochen vor Blütenöffnung, dabei werden vier Zellkerne produziert. Dieses Entwicklungsstadium wird als Tetrade bezeichnet. Jeder Zellkern entwickelt sich zu einem Pollenkorn (May 2004). Das Tapetum gibt Enzyme ab, wodurch sich die Tetrade löst und vier Mikrosporen freisetzt (Gutermuth 2016). Im zweiten Schritt findet die Mitose statt. Ergebnis ist, dass das Pollenkorn aus einem vegetativen und generativen Zellkern besteht (vgl. Abb. 3). Der vegetative Zellkern produziert den Pollenschlauch, während der generative Zellkern die Befruchtung vollzieht (May 2004).

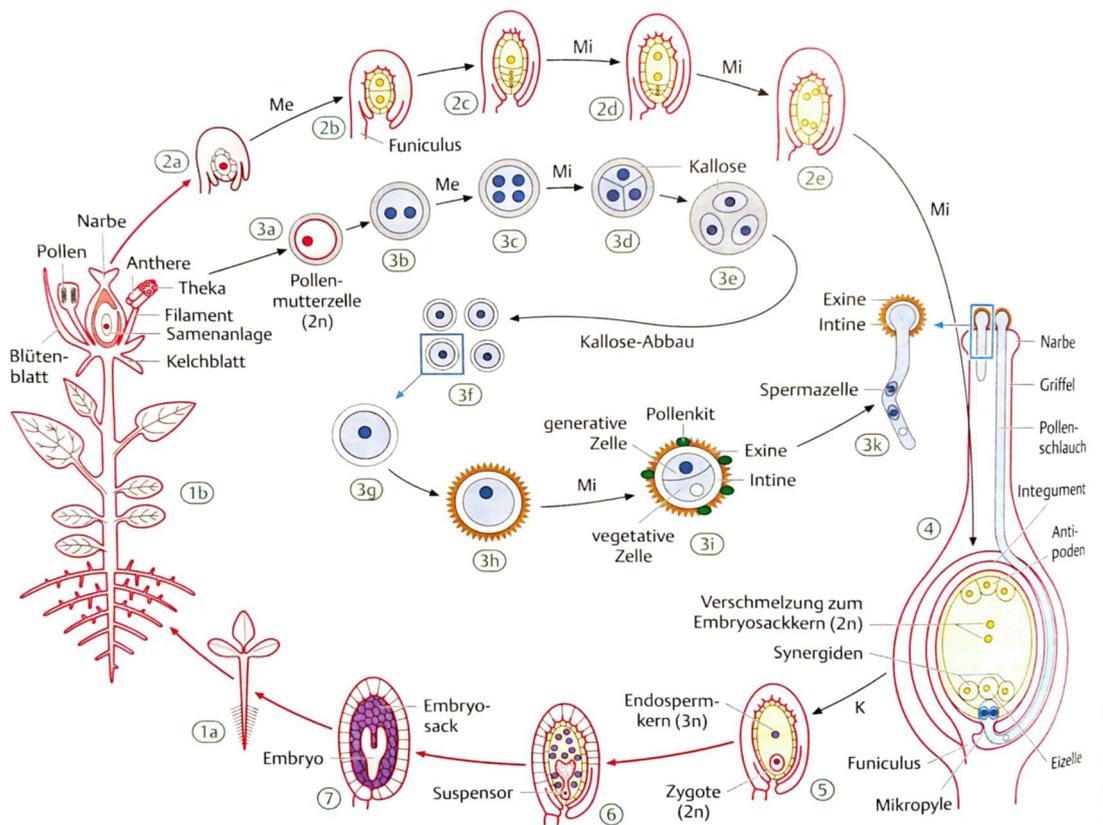


Abbildung 3: Allgemeine Entwicklung einer Samenpflanze: von der Gametenentwicklung bis zur Befruchtung und Embryoentwicklung. Quelle: (Weiler und Nover 2008)

Die Mitose erfolgt kurz vor Blütenöffnung, wenn die Pollen reif genug sind (Tello et al. 2018). Der Pollen ist oft schon einige Tage vor Blütenöffnung reif, noch bevor der Fruchtknoten vollständig zur Befruchtung bereit ist (Wagner 1960).

Durch eine fehlerhafte Entwicklung können auch infertile Pollen entstehen. Solche infertilen Pollen kommen z.B. bei weiblichen Sorten vor und können in verschiedenen Phasen der Pollenentwicklung entstehen. Grund dafür kann eine fehlende Meiose sein oder auch eine fehlende erste mitotische Teilung (Pratt 1971). Störungen in der Entwicklung können auch durch Umwelteinflüsse vorkommen und es entsteht Pollen, der nicht lebensfähig bzw. nicht keimfähig ist. Die Pollenkörner sind dann oft klein und eingeschrumpft (Heidmann et al. 2016). Wenn die Pollen keine Keimporen und Keimfurchen besitzen, können sie nicht auskeimen. Das ist z.B. der Fall bei der weiblichen Sorte Picolit giallo (Currle et al. 1983). ALVA ET AL. (2015) fanden bei allen untersuchten Sorten teilweise abnormale Pollen, die z.B. keine Furchen und Keimporen besaßen, diese Pollenkörner ähnelten denen von weiblichen Blüten.

2.2.2 Pollenlebensfähigkeit und Pollenkeimungsfähigkeit

Die Pollenlebensfähigkeit beschreibt die Fähigkeit des Pollenkorns nach erfolgreicher Bestäubung die generativen Pollenkerne zum Embryosack zu transportieren. Die Lebensfähigkeit kann also als Messung der Qualität bzw. Vitalität des Pollenkorns angesehen werden. Daher gibt es einen positiven Zusammenhang zwischen Pollenlebensfähigkeit und Pollenkeimungsfähigkeit (Tello et al. 2018). Die Pollenlebensfähigkeit ist daher der bedeutendste Faktor in Bezug auf eine erfolgreiche Befruchtung und damit einen guten Fruchtansatz (Baby et al. 2016). Der Wassergehalt von Pollenkörnern beträgt zwischen 15 und 35%. Durch Austrocknung oder ultraviolettes Licht kann die Lebensfähigkeit der Pollen beeinträchtigt werden (Vasconcelos et al. 2009).

Als normal bezeichnet wird eine Lebensfähigkeitsrate von 50-70%, jedoch gibt es große Schwankungen aufgrund verschiedener Ursachen. So kann die Pollenlebensfähigkeit zwischen den Sorten variieren. Hinzu kommen Effekte, die durch die Witterung hervorgerufen werden. Die Lebensfähigkeit und damit auch die Keimungsfähigkeit der Pollen auf der Narbe, werden außerdem durch das Alter der Pollen beeinflusst. Bei Experimenten von STAUDT (1986) lag die Keimungsrate für Pollen bei verschiedenen Experimenten kurz nach Käppchenabwurf bei 65%, wurde der Pollen erst später geerntet,

betrug die Rate 49%. Wurde der Pollen jedoch erst gesammelt, wenn die Narbe schon braun ist und die Antheren dunkelgelb, fiel die Keimungsrate auf 21%. Es gibt außerdem Klone, wie z.B. bei Riesling, deren Pollen schlechter keimen (May 2004). Auch bei Tempranillo Tinto wurden einerseits Klone gefunden, die eine sehr hohe Pollenlebensfähigkeit aufwiesen, als auch Klone, deren Pollen eine viel geringere Pollenlebensfähigkeit zeigten. Auch in ihren weinbaulichen Eigenschaften ergaben sich bei den Klonen Unterschiede. Zwei hatten kompakte Trauben mit einer hohen Beerenanzahl, zwei waren Klone mit weniger kompakten Trauben und weniger Beeren pro Traube. Die kompakten Klone zeigten eine höhere Pollenlebensfähigkeit als die Klone mit weniger Beeren pro Traube (Tello et al. 2018).

Die Pollenkeimung kann *in vitro* getestet werden, was sehr wichtig ist, um morphologische Eigenschaften zu charakterisieren und um die Vitalität der Pollen zu bestimmen. Für den *in vitro* Keimungstest wird Agar in Petrischalen gegossen, der Saccharose und eventuell weitere Zusätze enthält (May 2004). *In vitro* wird die Keimung und das Pollenschlauchwachstum durch Saccharose eingeleitet. Saccharose erhält den osmotischen Druck und ist ein energiereiches Substrat für den aktiven Pollen (Padureanu und Patras 2018). Die getestete Keimungsrate ist jedoch nur bedingt auf die Situation im Feld übertragbar. Die Befruchtung erfolgt, sobald ein Pollenschlauch eine der Eizellen erreicht. Das kann auch geschehen, wenn die Keimungsrate nicht mehr als 10% beträgt (May 2004). Es konnte festgestellt werden, dass *in vitro* die Pollenschläuche häufig ein weniger gutes Wachstum zeigen als *in vivo*, was mit den Wechselbeziehungen zwischen Pollenschlauch und Narbengewebe zusammenhängt (Staudt 1982). Außerdem ist in der Natur ein Überschuss an Pollenkörnern gegeben. Bei 20.000 Pollenkörnern pro Blüte sind auch bei einer Keimungsrate von 5% noch genügend keimungsfähige Pollenkörner vorhanden (Wagner 1962).

In vitro Tests zeigten außerdem, welche Mineralstoffe für die Keimung und das Pollenschlauchwachstum notwendig sind. Es wurde festgestellt, dass eine Konzentration von 100 mg/L Borsäure die Keimung stimuliert. Höhere Konzentrationen wie 1 g/L sind jedoch schädlich. Außerdem sind Gibberelline notwendig, damit der Pollenschlauch durch das Leitgewebe des Stempels wachsen kann. Die Lagerung des Pollens hat ebenfalls Einfluss auf die Keimfähigkeit. Die Keimungsrate nach einer Lagerung von 16h bei einer Temperatur von 22°C betrug 50%. Nach 70h fand jedoch keine Keimung mehr statt. Bei einer Lagerung

des Pollens unter 0°C, kann seine Lebensfähigkeit für ein Jahr aufrechterhalten werden (May 2004).

2.2.3 Alexanderlösung

Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Pollen ist die weit verbreitetste Methode die der Alexanderfärbung. Diese erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und nicht lebenden (sterilen) Pollenkörnern. Nachdem die Pollenkörner angefärbt sind, können die lebenden und nicht lebenden Pollenkörner manuell mit dem Auge ausgezählt werden. Lebende Pollenkörner färben sich dunkelblau bis lila, während sich nicht lebende Pollenkörner türkis färben. Auch die Größe der Pollenkörner ist ein Indikator für die Lebensfähigkeit. Lebende Pollenkörner sind normalerweise größer als die abgestorbenen (Tello et al. 2018).

Die Alexanderfärbung hat jedoch auch Nachteile. So kann bei manchen Arten die Lebensfähigkeit nicht durch die Alexanderlösung unterschieden werden. Außerdem ist die Zytotoxizität ein Problem, weil mit den Proben keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden können (Luria et al. 2019). Da die angefärbten Pollenkörner manuell ausgezählt werden, bringt dies einen weiteren Nachteil mit sich. Die Methode ist sehr zeitaufwendig und die Richtigkeit sowie die Genauigkeit der Daten kann negativ beeinflusst werden (Tello et al. 2018).

2.2.4 Durchflusszytometer

Eine verlässliche Methode zur Bestimmung der Pollenlebensfähigkeit ist das Verwenden eines mikrofluidischen Chips in Kombination mit einem Durchflusszytometer (engl. Impedance Flow Cytometer). Mithilfe des Durchflusszytometers kann bestimmt werden, in welchem Entwicklungsstadium sich das Pollenkorn befindet. Außerdem kann die Keimungsfähigkeit von reifen Pollen analysiert werden und die Größe der sich entwickelnden Pollen kann bestimmt werden (Heidmann und Di Berardino 2017).

Die Funktionsweise des Durchflusszytometers (engl. IFC) beruht auf den elektrischen Eigenschaften von Zellen, die auf den angewandten Wechselstrom reagieren. Die Frequenz des Wechselstroms kann variiert werden, so lassen sich Informationen über Zellgröße, Membrandurchlässigkeit und Leitfähigkeit des Cytoplasmas generieren (Heidmann und Di Berardino 2017). Die Ergebnisse drücken sich in Form der Amplitude und des

Phasenwinkels aus. Die Amplitude gibt Auskunft über die Zellgröße und die Änderung des Phasenwinkels des Widerstandssignals ist der Parameter zur Unterscheidung der toten Zellen von den lebenden. Beides wird in einer Punktauftragung dargestellt (Heidmann et al. 2016). Der mikrofluidische Chip besteht aus einem Kanal mit einer Größe zwischen 50 und 250 μm sowie der Messelektrode M und der Referenzelektrode R, hier wird der Wechselstrom angelegt. Wenn eine Zelle das elektrische Feld passiert, ändert sie den Widerstandswert der Flüssigkeit in einer bestimmten Art. Das Signal des Widerstands ist unterschiedlich für lebende und tote Zellen. Tote Zellen sind kleiner und kompakter, dadurch ist das Signal in Amplitude und Phasenwinkel kleiner als bei einer Zelle, die physiologisch aktiv ist (Heidmann und Di Berardino 2017).

Vorgehensweise IFC

Bei der Analyse von Pollenproben mittels IFC geht man folgendermaßen vor. Es werden Mikrosporen, reife, oder unreife Pollenkörner geerntet und in speziellen Messpuffern resuspendiert. Dann wird die Suspension filtriert, um alle Partikel zu entfernen, die größer als die Pollenkörner sind und so den mikrofluidischen Chip verstopfen könnten. Die Probe wird dann durch ein Durchflusszytometer mit Standardeinstellungen geschickt. Die Daten der zu analysierenden Zellen werden in Amplituden/Phasenwinkel Punktdiagrammen und Histogrammen dargestellt, durch die die Pollenpopulation charakterisiert wird (Heidmann und Di Berardino 2017).

Zunächst können tote von lebenden Pollen unterschieden werden, da die lebenden Pollen einen höheren Amplitudenwert und einen höheren Phasenwinkel aufzeigen. Pollen, die keimfähig sind, sind Teil der lebenden Population (Heidmann und Di Berardino 2017). Um die toten Pollen klar von den lebenden zu unterscheiden, wird eine nicht-lebende Kontrolle hergestellt, indem ein Aliquot der Pollensuspension hohen Temperaturen von 40-60°C für 15 Min ausgesetzt wird. In den nicht behandelten Pollenproben können zwei Populationen ausgemacht werden, eine mit einem niedrigeren Phasenwinkel und eine mit einem hohen. Die hitzebehandelte Probe zeigt eine Population mit einem niedrigen Phasenwinkel, was die Population mit dem hohen Phasenwinkel als die Lebende identifiziert, da sie nach Inaktivierung durch Hitze nicht mehr zu finden ist (Heidmann et al. 2016).

Zur Untersuchung der Keimungsfähigkeit werden die Pollen innerhalb eines Keimungspuffers z.B. nach BREWBAKER UND KWAK (1963) untersucht. Dafür werden etwa 200 Pollenkörner pro Probe analysiert. Mithilfe der IFC können die keimungsfähigen Pollen von den nicht-keimungsfähigen Pollen unterschieden werden. Pollen, der zu einer aktiven Rehydrierung nicht fähig ist, hat einen geringeren Wassergehalt und eine langsamere aktive Aufnahme. Das zeigt sich in einem anderen Widerstand im elektrischen Feld. Eine keimungsinaktivierte Kontrolle ist sehr wichtig, da in einer natürlichen Population die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Populationen schwieriger ist. Grund dafür ist, dass in der Natur die Pollen nicht alle gleich entwickelt sind und sich so ein Gradient von aktivierten bis hin zu inaktivierten Pollen zeigt. Um die keimungsfähige Population auszumachen, wird also eine normale Probe mit einer hitzeinaktivierten Kontrolle sowie einer Mischprobe beider verglichen. Wenn in der inaktivierten Kontrolle die Population mit dem höchsten Phasenwinkel nicht gefunden wird, muss es sich um die keimungsfähige Population handeln (Heidmann et al. 2016).

Die Methode der IFC bringt einige Vorteile mit sich, so können z.B. einzelne Zellen untersucht werden. Die Technik erlaubt außerdem eine Analyse unabhängig der Arten und die Proben werden nicht beschädigt. Ein weiterer Vorteil der IFC Methode ist die große Anzahl an Zellen, die untersucht werden kann. In weniger als zehn Sekunden können 5×10^3 Zellen in einem standardisierten Ablauf analysiert werden (Heidmann et al. 2016).

2.3 Fruchtansatz

Die Anzahl der Blüten, die zu Beeren werden, ist etwa ein bis zwei Wochen nach der Blüte festgelegt. Quantitativ kann der Fruchtansatz als die Anzahl der Fruchtknoten, die zur Beere werden, bezeichnet werden (Dry et al. 2010). Es ist ein normaler Prozess, dass nicht alle Blüten zu Beeren werden, sondern ein gewisser Prozentsatz abgestoßen wird. Das Abwerfen findet einige Tage nach Anthese statt (May 2004). Als normal wird ein Fruchtansatz angesehen, der über 50% liegt, unter 30% ist der Fruchtansatz gering (Baby et al. 2016).

Das Verrieseln (frz. Coulure), also das Abstoßen von Einzelblüten, kann durch verschiedene Umweltfaktoren verursacht werden. Dazu gehören Temperatur, Licht, Trockenstress und exzessive Feuchtigkeit (Lebon et al. 2008). CURRLE ET AL. (1983) sieht die wichtigsten Hauptursachen für Verrieselung in einer schlechten Nährstoffversorgung und einer schlechten Witterung vor und während der Blüte. Außerdem ist der Grad der Verrieselung

abhängig von der Blütenzahl. Gescheine mit vielen Blüten neigen eher zur Verrieselung, da hier eine Selbstregulation verstärkt aufzutreten scheint. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Insertionshöhe am Trieb: die Verrieselung nimmt aufwärtssteigend am Trieb ab. Als Grund dafür werden die fotosynthetisch aktivsten Blätter in der Mitte des Triebs genannt. Außerdem nimmt die Zahl der Blüten mit steigender Insertionshöhe ab, die Blüten haben also untereinander eine geringere Konkurrenz. Für eine hohe Befruchtungszahl und damit eine geringe Verrieselung, ist eine ausreichende Versorgung mit Assimilaten und damit eine ausreichende Laubfläche von Bedeutung (Currell et al. 1983). Die Versorgung der Infloreszenzen mit Nährstoffen ist jedoch auch abhängig von den im Vorjahr eingelagerten Reservestoffen. Diese Abhängigkeit besteht, bis die ersten Blätter die Hälfte ihrer späteren Größe erreicht haben. Das Verrieseln führt zu einer sehr lockeren Traubenstruktur (Keller 2010).

Wird die Triebspitze zur Anthese gekappt, fördert das den Fruchtansatz, da der junge wachsende Trieb eine starke Konkurrenz um Nährstoffe darstellt. Eine längere Periode von tiefen Temperaturen führt zu einem geringen Fruchtansatz, ebenso wie Regen, insbesondere in Kombination mit geringen Temperaturen. Doch auch sehr hohe Temperaturen um den Zeitraum der Blüte wirken sich negativ auf die Blüte und damit den Fruchtansatz aus. Der Genotyp spielt dabei auch eine Rolle, so sind manche Sorten anfälliger gegenüber schlechter Witterung während der Blüte und neigen daher schneller zu einem geringen Fruchtansatz. Dazu zählen z.B. Riesling, Chardonnay und Grenache (May 2004).

Im Zusammenhang mit der Blüte führen eine geringe Pollenvitalität, eine geringe Fertilität der Samenanlagen oder eine geringe Keimungsrate zu einem geringeren Fruchtansatz, was zum exzessiven Abwurf der Blüten führen kann (Tello et al. 2018).

Bei den Samenanlagen gibt es zwei Arten der Degeneration. Beim ersten Degenerationstypen degeneriert der normal ausgebildete Embryosack aufgrund ausbleibender Befruchtung. Daraufhin wird der Fruchtknoten etwa neun Tage nach dem Aufblühen durch Ausbilden eines Trenngewebes abgeworfen. Beim zweiten Degenerationstyp besitzt die Samenanlage keinen Embryosack. Der Nucellus degeneriert in diesem Fall jedoch nicht, sondern wächst ein wenig. Diese Fruchtknoten bleiben bis zur Reife an der Infloreszenz hängen, sie sind sehr klein und bleiben hart. Grund für das Hängenbleiben scheint das leichte Wachstum des Nucellus zu sein, weswegen sich das

Trenngewebe am Blütenstielchen nicht bildet (Kassemeyer und Staudt 1982). Diese lebenden, grünen Fruchtknoten scheinen durch die hormonelle Stimulierung des Pollenschlauchwachstums zu entstehen (Friend et al. 2009).

Ein weiterer Begriff im Zusammenhang mit dem Fruchtansatz ist „Millerandage“. Im Gegensatz zu „Coulure“ wird „Millerandage“ als Vorkommen von normal großen, samenhaltigen Beeren, zusammen mit kleinen (<3mm) sowie mittelgroßen (3-6mm), samenlosen Beeren an einer Traube bezeichnet (Alva et al. 2015).

Es gibt zwei verschiedene Arten von Samenlosigkeit bei Beeren. Die erste ist die Stimulative Parthenocarpie. Hier unterbleibt die Befruchtung, die Blüten werden jedoch nicht abgeworfen. Denn durch das Pollenschlauchwachstum werden Hormone ausgeschüttet, die dazu führen, dass der Fruchtknoten trotzdem wächst. Diese Beeren bleiben jedoch klein. Bei der zweiten Art, der Stenospermokarpie läuft die Befruchtung normal ab. Doch die Entwicklung des Eiapparates stagniert und so bleiben in einzelnen Beeren Rudimente von Samen zurück (Currle et al. 1983). Die Endosperm Bildung wird meist unterbrochen, noch bevor die Teilung der Zygote begonnen hat, die Samen bleiben sehr klein und weich (Staudt und Kassemeyer 1984). Samenlose, kleine Beeren und grüne, lebende Fruchtknoten besitzen dieselbe Anzahl an Zellen. Der fehlende, reife Samen scheint also die Zellteilung zu verhindern, während eine Zellstreckung stattfindet, die die unterschiedliche Größe beider ausmacht (Friend et al. 2009).

2.4 Der Samen

2.4.1 Samen Anatomie und Morphologie

Der Samen ist ein Verbreitungsorgan, das den Embryo und ein Nährgewebe enthält, das Endosperm. Umgeben ist der Samen von einer Samenschale, der Testa (Schopfer und Brennicke 2010). Die Samenschale ist mehrschichtig und besteht aus äußerer, mittlerer und innerer Samenschale (Currle et al. 1983). Die Samenschale hat wichtige Schutzfunktionen, sie bewahrt den Embryo vor mechanischen Verletzungen oder auch Pilzbefall. Außerdem wird die Verbreitung der Samen sichergestellt, da die Samen so den Verdauungstrakt von Tieren passieren können (Elias et al. 2012).

Der reife Embryo besteht aus zwei Kotyledonen, einem kurzen Hypokotyl und einem apikalen Meristem, dem Epikotyl (Pratt 1971). Der Embryo ist sehr klein, bei Riesling z.B. beträgt seine Größe 2mm, die Größe kann jedoch stark variieren (Currel et al. 1983).

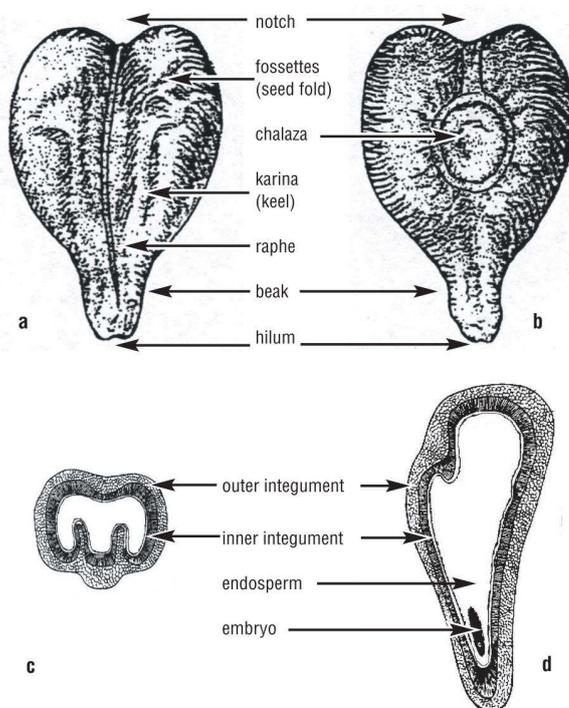


Abbildung 4: Anatomie der ventralen Seite (a) und der dorsalen Seite (b) eines ausgereiften Samens. Querschnitt (c) und Längsschnitt (d) durch einen Samen zeigt das Endosperm, die Testa und den Embryo. Quelle: (Ristic und Iland 2005)

Die Morphologie eines voll entwickelten Samens ist eine konstante Eigenschaft und dient daher der Identifikation von Sorten. Bei *V. vinifera* Sorten sind die reifen Samen meistens birnen-förmig, der Schnabel kann jedoch in der Länge und Dicke variieren. Er kann außerdem gerade oder geknickt sein, rau, weich oder zerknittert sein. Der Winkel am Samennabel (Hilum) variiert ebenfalls in seiner Stärke (Ristic und Iland 2005). Der Embryo liegt im Schnabel, dem basalen Ende des Samens (Currel et al. 1983). Am anderen Ende des Kerns, gegenüber des Schnabels, befindet sich eine Einkerbung, die größer oder kleiner ausfallen kann. Die Rückenseite des Samens ist dick und rundlich. In der Mitte liegt die Chalaza, eine zirkuläre oder ovale Vertiefung, die versunken oder erhoben sein kann (Ristic und Iland 2005). Die vaskulären Bündel, die den Samen mit der Beere verbinden, enden in der Chalaza (Gerrath et al. 2015). Bei *V. vinifera* liegt die Chalaza genau in der Mitte oder in Richtung der Einkerbung. Auf der Bauchseite befindet sich eine kielartige Erhebung,

diese kann mehr oder weniger ausgeprägt sein sowie eine rundliche oder spitze Form haben. Vom Samennabel über die Einkerbung bis hin zur Chalaza auf der Rückenseite zieht sich die Raphe. Auf beiden Seite der Raphe befinden sich die Kernfalten (vgl. Abb.4) (Ristic und Iland 2005).

2.4.2 Entwicklung

Als Samen bezeichnet man die befruchteten und reifen Samenanlagen. Während der Samenreifung entwickelt sich die harte Samenschale, die Testa, aus den Integumenten der Samenanlagen (Gerrath et al. 2015). Die Samen der Angiospermen zeichnen sich dadurch aus, dass sie in einem Fruchtknoten eingeschlossen sind (Elias et al. 2012).

Allgemein lässt sich die Samenentwicklung in drei Phasen unterteilen. Die erste ist die Wachstumsphase, in der das Frischgewicht schnell zunimmt und am Ende dieser Phase das Maximum erreicht (Ristic und Iland 2005). Es ist eine Phase der schnellen Zellteilung, während derer die Samenstrukturen gebildet werden (Cadot et al. 2006). Auch die Größe des Samens nimmt zu. Die zunächst hellgrüne Farbe der Samenschale wechselt zum Ende der ersten Phase zu gelb-grün. In der zweiten, der Übergangsphase, nimmt der Wassergehalt sowie das Trockengewicht langsam ab. Das basale Ende des Kerns wächst deutlich. Die Samenschale hat jetzt eine maisgelbe Farbe. Die dritte Phase ist die der Trocknung und Reifung. Das Trockengewicht nimmt zu, während das Frischgewicht und der Wassergehalt schnell abnehmen. Das Wachstum des Embryos stoppt und der Samen trocknet. Der Wasserverlust beginnt in der Samenschale, das Absterben der Zellen führt dazu, dass der Samen undurchlässig wird und die Dormanz eingeleitet werden kann (Ristic und Iland 2005).

Entwicklung Endosperm und Embryo

Innerhalb von 24 Stunden nach der Befruchtung nimmt das Volumen der Embryosackzelle um das 1,53-fache zu und bleibt während der folgenden sieben Tage gleich. Diese Zeitspanne scheint stark abhängig von den Umweltbedingungen zu sein. Innerhalb von 22 Tagen nach Blühbeginn erweitert sich die Länge der Samenlänge um das 10-fache. Die Entwicklung des Endosperms beginnt schon 24h nach Befruchtung. Der triploide Zellkern, der durch das Verschmelzen der beiden Embryosackkerne und einer Spermazelle entstanden ist, teilt sich einen Tag später, weitere Teilungen finden alle drei bis vier Tage für etwa 20

Tage statt. Danach werden die Zellwände geformt und das Endosperm wird somit zellulär. Die Entwicklung der Zygote findet später statt als die des Endosperms (May 2004). Wenn das Endosperm wächst, ersetzt es 35 Tage nach Blühbeginn den Nucellus (Ristic und Iland 2005).

Die Entwicklung des Proembryos erfolgt nach dem Zellulärwerden des Endosperms. Grund dafür könnte sein, dass das Endosperm erst dann in der Lage ist, den Embryo zu versorgen (Kassemeyer und Staudt 1983). Die Nährstoffversorgung des Embryos ist essenziell für seine Entwicklung. Wenn diese unzureichend ist, kann sich die Entwicklung verzögern und die Samenanlagen können ganz absterben (Weiler und Nover 2008). Nach der Befruchtung gibt es eine kurze Phase der Reorganisation, in der das Cytoplasma der Zygote homogener wird und der Zellkern zu wachsen anfängt. Im weiteren Verlauf wächst die Zygote entlang ihrer horizontalen Achse. Die Entwicklung des Embryos beginnt mit den ersten Zellteilungen der Zygote, der Proembryo entsteht. Die apikalen Zellen teilen sich sehr häufig und formen so den Großteil des Embryos. Durch Zellteilungen des basalen Endes entsteht ein Suspensor. Durch weitere Teilungen des Suspensors wird der Embryo immer weiter nach oben in das Innere des Embryosacks geschoben (Elias et al. 2012). Durch Zellteilungen der apikalen Zelle entstehen die Kotyledonen und das Epikotyl. Die basale Zelle wird zum Hypokotyl, zu den Wurzelanfängen und dem Suspensor geformt. Der Suspensor verbindet den Embryo mit der Zellwand des Embryosacks (Pratt 1971). Bei *Vitis* ist der Suspensor nur wenig entwickelt, somit können dort keine Phytohormone synthetisiert werden, weshalb der Embryo abhängig von der Phytohormonzufuhr aus dem Endosperm ist (Kassemeyer und Staudt 1983). Der erste Schritt der Differenzierung des Embryos ist die Festlegung der Polarität durch die longitudinale Achse, die sogenannte Oben-Unten-Orientierung. Danach etabliert sich die radiale Achse (Schopfer und Brennicke 2010). Das Wachstum des Embryos wird ab der *Véraison* immer schneller, seine maximale Größe wird etwa 70-100 Tage nach der Blüte erreicht (Ristic und Iland 2005).

Entwicklung Samenschale

Physiologisch betrachtet gibt es drei Prozesse, die jeder Samen durchläuft. Diese sind Wachstum, Einlagerung von Reservestoffen wie Öle, Stärke und Proteine und schließlich die Einleitung der Dormanz. Die Samenschale hat während dieser Entwicklung unterschiedliche Funktionen. Im frühen Stadium ist die Samenschale ein Transportweg,

durch den Zucker und Säuren vom Pericarp in den Embryosack geleitet werden. Reservestoffe akkumulieren und Enzyme und Wachstumsstoffe werden bereitgestellt. Außerdem stellt die Samenschale einen Schutz gegen mechanische Verletzungen und Austrocknung dar. Ist der Samen reif, so agiert die Schale weiterhin als Schutz vor mechanischen Verletzungen des Embryos und ist daran beteiligt, die Dormanz aufrecht zu erhalten. Während der Entwicklung des Samens unterliegt die Samenschale strukturellen und chemischen Transformationen. Manche davon lassen sich im Wechsel der Farbe der Samenschale erkennen. Die meristematische Aktivität in den drei Schichten der äußeren Samenschale erreicht ihren Höhepunkt etwa 20-25 Tage nach Anthese, bis sie 45 Tage nach Anthese bei null ist. Durch die Lignifizierung der inneren Schicht der äußeren Samenschale wird der Kern schließlich hart. Diese Entwicklung geht mit einer Verfärbung von grün nach braun einher. Die innere Samenschale bleibt jedoch dünn und haftet am Endosperm (Ristic und Iland 2005).

Zusammenhang Samen- und Beerenentwicklung

Die Entwicklung der Samen beeinflusst die der gesamten Beeren. Es gibt eine positive Korrelation zwischen Samenzahl, Beerengewicht und Beerengröße (Ristic und Iland 2005). Die Fruchtentwicklung nach der Befruchtung ist abhängig von der Auxinkonzentration, die in den Samen gebildet wird. Daher ist für eine normale Beerenentwicklung das Vorhandensein von mindestens einem Samen erforderlich (Keller 2010). Der Zusammenhang zwischen Anzahl der Samen und Beerengröße scheint außerdem in seiner Intensität sortenabhängig zu sein. Im Durchschnitt vergrößert sich die Beere pro Samen um 0,21 bis 0,36 cm³ (Currell et al. 1983). Eine Beere enthält maximal vier Samen, die aus vier Samenanlagen entstanden sind. Meistens haben Beeren jedoch weniger als vier Kerne. Während der ersten Entwicklungsphase der Beeren, wachsen auch die Samen. Am Ende dieser Phase haben diese fast ihre normale Größe erreicht, jedoch ist der Embryo an diesem Punkt noch sehr klein. Die zweite Phase der Beerenentwicklung beginnt mit der Véraison, bei welcher das Wachstum der Samen endet (Ristic und Iland 2005).

Gestörte Samenentwicklung

Viele der Samenanlagen entwickeln sich nicht zu normalen, funktionalen Samen. Werden die Samenanlagen z.B. nicht befruchtet, bleiben sie als Samenanlagen zurück, oder wachsen etwas und werden somit als kleine Samenrudimente sichtbar. Die Hülle dieser kleinen Samen wird braun, sie bleiben jedoch weich. Die Samenanlagen können sich außerdem zu normalen Samen entwickeln, ohne dass sie eine Zygote enthalten. Das Endosperm dieser Samen verfällt 42 Tage nach Anthese und ist später nicht mehr vorhanden (May 2004). Bei der Schwimmprobe lassen sich diese nicht keimfähigen Samen aussortieren, dabei sinken die schweren, funktionsfähigen Samen zu Boden (Lott 1969). Die sogenannten Schwimmer sind hohle, nicht funktionsfähige Kerne, die im Wasser aufschwimmen. Von außen lassen sie sich jedoch nicht von den lebenden, funktionsfähigen Samen unterscheiden (May 2000). LOTT (1969) fand je nach Sorte und Jahrgang bis zu 50% Samen, die ein normales Endosperm hatten, jedoch keinen Embryo. Diese Samen werden durch die Schwimmprobe nicht aussortiert, obwohl sie ebenfalls nicht keimfähig sind (Lott 1969).

2.4.3 Samen Vitalität

Die Association of Official Seed Analysts definiert die Samenvitalität als die Gesamtheit der Eigenschaften des Samens, die eine schnelle und gleiche Entwicklung von normalen Sämlingen, unter verschiedenen Feldbedingungen erlaubt (Elias et al. 2012).

Die Keimungsfähigkeit der Samen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, auf der einen Seite sind diese genetisch bedingt, auf der anderen durch Umweltfaktoren. Dazu zählt z.B. die Temperatur während der Samenentwicklung, die zu Jahrgangsschwankungen führt. Dabei kann es zur Stagnation der Embryoentwicklung kommen (Currel et al. 1983). Nach LOTT (1969) ist eine schlechte Keimfähigkeit nicht die Folge einer Befruchtungsstörung. Die kritische Phase, die Einfluss auf die Reproduktionskraft der Samen hat, ist vier bis sechs Wochen ab der Blüte. Niedrige Temperaturen scheinen dabei schädlicher zu sein als hohe Temperaturen. Insgesamt ist der Wärmeanspruch der Samen in den ersten Wochen nach Befruchtung recht hoch (Lott 1969). Insgesamt konnte LOTT (1969) eine enge Korrelation zwischen den Durchschnittstemperaturen sowie den Maximal- und Minimaltemperaturen während der ersten sechs Wochen ab Blüte und der Keimfähigkeit der Samen feststellen. Die Temperatur nach den abgelaufenen sechs Wochen nach Blühbeginn bis zur Ernte scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen (Currel et al. 1983). Tiefe Temperaturen um 12°C eine

Woche vor Anthese bzw. zum Blühbeginn sowie eine Abschattung resultieren in einer geringeren Anzahl von funktionsfähigen Samen pro Beere (Ebadi et al. 1996).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Keimfähigkeit des Samens beeinflusst, ist die Nährstoffversorgung der Mutterpflanze. Hat der Samen seine physiologische Reife erreicht, kann außerdem jeder Umwelteinfluss während des Erntens, der Lagerung oder Aufbereitung zu einer Reduktion der Keimungsfähigkeit führen (Elias et al. 2012).

Durch Trocknen der Samen wird die Samenruhe induziert, sodass bei einer Trocknung von 50 auf 20% Wassergehalt, die Keimzahlen von 70 auf 30% zurück gingen. Durch Stratifikation kann die Keimhemmung wieder teilweise aufgehoben werden, doch die höchste Keimrate zeigt sich bei der Direktsaat (Lott 1969).

Topografischer Tetrazolium Test

Wenn ein Samen nicht auskeimt, kann dies an der fehlenden Vitalität oder an der Dormanz liegen. Das Ausbleiben des Keimens kann verschiedene Ursachen haben: der Samen kann tot sein, leer oder dormant. Der Topografische Tetrazolium Test (TZ Test) kann zur Hilfe genommen werden, um festzustellen, ob ein Samen tot oder dormant ist. Der TZ Test nach Lakon (1942) ist heute ein weit verbreiteter Schnelltest zur Überprüfung der Kernvitalität (Elias et al. 2012).

Das Prinzip des Tests basiert auf der Färbung des Embryos als Reaktion auf die Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Lösung. Weiterhin wird die physische Situation des Samens beurteilt, ausschlaggebend kann z.B. ein zersetztes Endosperm sein (Elias et al. 2012). Durch den TZ Test wird indirekt die respiratorische Aktivität in den Zellen bestimmt. Der Test beruht auf der Aktivität von Dehydrogenasen. Diese katalysieren die respiratorischen Reaktionen in den Mitochondrien während der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus (França-Neto und Krzyzanowski 2019). Während dieser Reaktionen werden Wasserstoffionen abgegeben, die wiederum die 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung reduzieren. Dadurch färbt sich die zunächst klare, farblose Lösung in einen roten Farbstoff (vgl. Abb. 5) (Elias et al. 2012).

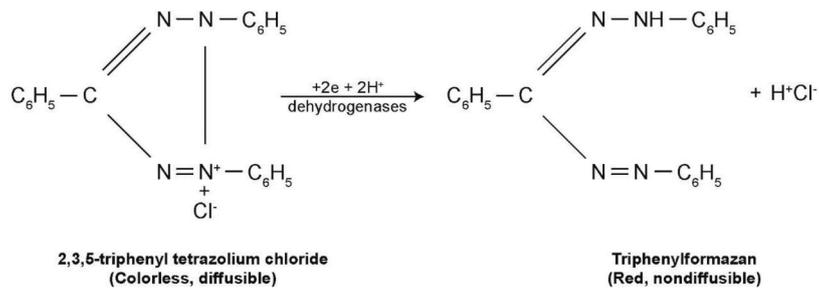


Abbildung 5: Reduktion des farblosen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zum rot gefärbten Triphenylformazan in lebenden Zellen. Quelle: (França-Neto und Krzyzanowski 2019)

Die rote Farbe ist ein Indiz für die Atmungsaktivität in den Mitochondrien von Zellen und damit indirekt Indikator für die Viabilität der Zellen. Solche atmungsaktiven Gewebe befinden sich im Embryo und im Endosperm. Totes Gewebe reagiert folglich nicht mit dem TTC und färbt sich somit nicht an (França-Neto und Krzyzanowski 2019). Auch die Intensität der Färbung kann betrachtet werden, um so eine Aussage zur Vitalität des Samens zu treffen (Elias et al. 2012). So färbt sich ein vitales Gewebe matt rot, während ein geschwächtes Gewebe sich durch die schnelle Diffusion der TTC Lösung durch die beschädigten Zellmembranen intensiv rot färbt. Totes Gewebe hingegen ist aufgrund der fehlenden Reduktion des Tetrazolium Salzes weiß gefärbt (França-Neto und Krzyzanowski 2019).

Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, können die Samen gewässert bzw. angefeuchtet werden, so werden die respiratorischen Enzyme aktiviert. Die Atmungsrate wird durch die Dehydrogenase Aktivität in den befeuchteten Samen erhöht. Dieser vorbereitende Schritt ist somit entscheidend, damit die Tetrazolium Reaktion stattfindet und die Färbung erscheint. Das Wässern findet normalerweise über Nacht mithilfe von nassen Papiertüchern oder sortenabhängig durch direktes Einweichen statt. Bei Samen, die sich in einer tiefen Dormanz befinden, kann es förderlich sein die Samen in einer Gibberellinsäure Lösung zu wässern. Ein weiterer Grund für das Wässern ist, dass das Gewebe so weicher wird und der Schnitt durch den Samen genauer erfolgen kann. Das Aufschneiden des Samens, Entfernen der Samenschale, oder Durchstechen der Samenschale verbessert die Aufnahme der Tetrazolium Lösung durch den Embryo. Grund dafür ist, dass viele Samen nicht permeabel sind für die großen Tetrazolium Moleküle. Die Zeit der Färbung kann außerdem reduziert werden, indem die Temperatur auf über 35°C erhöht wird (Elias et al. 2012).

Für eine erfolgreiche Durchführung des Tests muss der Analyst die Strukturen des Samens und die Sämlingsstrukturen kennen, die sich aus dem Embryo entwickeln. Dazu gehört z.B. das Aussehen des Embryos, seine Position im Samen und das Aussehen des Nährgewebes. Er sollte außerdem zwischen normalen und abnormalen Samen unterscheiden können (Elias et al. 2012).

Der große Vorteil des TZ Tests gegenüber dem Standard Keimungsversuch liegt vor allem in der Geschwindigkeit, in der Resultate hervorgebracht werden (Elias et al. 2012). Ein weiterer Vorteil ist, dass der Test nicht durch den Faktor Dormanz beeinflusst wird. Außerdem ist das erforderliche Equipment kostengünstig und anwenderfreundlich (França-Neto und Krzyzanowski 2019). Anwendungsbereiche findet der Test daher in der Beurteilung der Samenviabilität als Alternative zum Keimungstest oder auch zur Beurteilung vor der Ernte. So kann z.B. überprüft werden, inwieweit durch ErnteprozEDUREN dem Samen mechanische Verletzungen hinzugefügt werden. Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich ist außerdem die Untersuchung von dormanten Samen, da der TZ Test die Viabilität von dormanten und nicht dormanten Samen ermitteln kann. Für genauere Aussagen kann der Test auch mit einem Keimungstest kombiniert werden. Eine andere Möglichkeit ist, den TZ Test nach einem Keimungstest durchzuführen, um zu überprüfen, ob nicht gekeimte Samen tot oder dormant sind (Elias et al. 2012).

Ein Nachteil des Tests ist, dass zwar auch die Viabilität von dormanten Samen ermittelt werden kann, jedoch kann der Test die dormanten Samen nicht von den nicht dormanten Samen unterscheiden. Außerdem können z.B. keine Pilzinfektionen erkannt werden. Ein weiterer großer Nachteil ist auch, dass der Test eine hohe Erfahrung und Training des Analysierenden erfordert. Außerdem beinhaltet die Interpretation der Färbung auch immer eine gewisse Subjektivität (Elias et al. 2012).

3 Material und Methoden

3.1 Techniken zur Pollenisolation

Die Pollenisolation sollte im Zeitraum der ersten sich lösenden Blütenköppchen bis zur Vollblüte geschehen. Meistens wird der Pollen zur Vollblüte geerntet (Kelen und Demirtas 2003; Tello et al. 2018; Alva et al. 2015). Auch in diesem Fall wurde der Pollen zur Vollblüte geerntet, damit sich genug Pollen abschütteln lassen, da nur eine begrenzte Anzahl an Gescheinen zur Verfügung stand. Um das Geschein wurde ein 250ml Becherglas gestülpt und leicht geschüttelt, sodass die Pollen ins Glas fallen und dort haften bleiben. Der Inhalt des Becherglases (Antheren, Pollen und Blütenköppchen) wurde mithilfe eines Retsch Siebes der Porengröße 0,063 mm gesiebt, dazu wurde ein weicher Pinsel benutzt. Unter das Sieb wurde eine Glasplatte gelegt, da die Pollen durch das Sieb fallen und am Glas haften bleiben. Unter der Glasplatte befand sich ein schwarzer Untergrund, damit der Pollen besser erkennbar ist. Auf der Glasplatte wurden der Pollen schließlich mit einem Zellschieber der Länge 25cm der Firma Sarstedt zusammengeschoben. Der isolierte Pollen konnte zur Aufbewahrung mithilfe eines Spatels in ein Rollrandglas gegeben werden. Pollen, die am Rand des Becherglases haften blieben, wurden ebenfalls mit einem Zellschaber zusammengeschoben und mithilfe eines spitzen Spatels in das Rollrandglas gegeben (vgl. Abb. 6).



Abbildung 6: Pollenisolation. v. l. n. r.: Materialien zum Sieben der Pollen. Pollen ist nach dem Sieben auf dem schwarzen Untergrund gut zu erkennen. Zusammenschieben des Pollens auf der Glasplatte mithilfe eines Zellschiebers.

Die sicherste Methode, um Pollen zu ernten, ist das Eintüten der Gescheine. Dies sollte kurz vor dem Aufblühen im Entwicklungsstadium ES 57 geschehen. Dazu wurden für die Versuche mit den verschiedenen Sorten beschriftete Papiertüten um die Gescheine gestülpt und mit einem Draht befestigt, so dass die Tüten nicht wegwehen konnten und der Pollen

nicht herausfiel. Das Eintüten verhindert außerdem, dass Fremdpollen eindringt und mituntersucht wird. Zum Zeitpunkt der Vollblüte (ES 65) war genügend Pollen vorhanden und die Tüten konnten eingesammelt werden. Sollten die Tüten feucht oder nass sein, mussten diese erst für einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet werden. Da die Tüten jedoch an trockenen Tagen eingesammelt wurden, konnte der Pollen direkt isoliert werden. Die Isolation erfolgte durch das Sieben wie oben beschrieben.

3.2 Untersuchungen zur Pollenlebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit

3.2.1 Untersuchung Pollenkeimungsfähigkeit mittels Keimungsmedien

In der Literatur finden sich verschiedene Medien und Konzentrationen von Zuckerlösungen, mit denen sich die Keimungsrate der Pollen untersuchen lässt (Kelen und Demirtas 2003; Baby et al. 2016; Korkutal et al. 2019). Deshalb wurden folgende Zuckerkonzentrationen getestet: 5%, 10% und 15%. Außerdem wurden zwei Medien mit zugesetzter Borsäure überprüft, da Borsäure die Keimung *in vitro* stimulieren soll (May 2004). Das erste ist das Brewbaker Medium, welches von BREWBAKER UND KWAK (1963) modifiziert wurde (Baby et al. 2016). Es setzt sich folgendermaßen zusammen: 15% Saccharose, 1,6 mmol/L Ca (NO₃)₂·4H₂O, 1 mmol/L KNO₃, 0,81 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 1,6 mmol/L H₃BO₃. Alles wird in 1 mmol/L 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) gegeben und mit (Hydroxymethyl)-aminomethan gepuffert auf pH 5,6 (Baby et al. 2016). Zusätzlich wurde mit dem Medium getestet, das Acepo aus den Niederlanden als Keimungsmedium benutzt und zur Verfügung gestellt hat, die genauen Inhaltsstoffe dürfen nicht genannt werden. Aber auch das Acepo Medium enthält wie das Brewbaker Medium Borsäure. Am Ende wurde schließlich für die Untersuchungen zur Pollenkeimungsrate der verschiedenen Töpfe die 10%ige Zuckerlösung genommen, da diese sich in Vorversuchen als geeignet darstellte. Zeitlich fanden diese Untersuchungen nach den Experimenten zu den verschiedenen Konzentrationen und Medien statt. Es wurden auch Vorversuche mit Agar-/Zuckermedien durchgeführt, doch diese stellten sich direkt als ungeeignet heraus, da hier die Pollenschläuche sehr schlecht gezählt werden konnten.

Die Zuckerlösungen und Medien wurden in einer 1 L Glasflasche im Kühlschrank aufbewahrt und vor Verwendung in einem warmen Wasserbad erwärmt. Mit einer 10 ml Glaspipette wurden dann 2 ml der Lösung in eine Petrischale mit Entlüftungsnocken (Firma Sarstedt) mit einem Durchmesser von 5,5 cm gegeben. Dann wurde die Pinselspitze in das

Rollrandglas getaucht und einmal mit dem Finger auf den Pinsel getippt, um so den Pollen in der Petrischale zu verteilen (vgl. Abb. 7). Die Petrischalen wurden geschlossen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, um am nächsten Tag die Pollenschlauchbildung zu betrachten.



Abbildung 7: Verteilen des Pollens auf dem Keimungsmedium in Petrischalen.

Auswertung:

Am nächsten Tag wurden schließlich Fotos mit der Moticam Kamera unter dem Wild M3 Binokular der Firma Herbrugg aufgenommen, um so die gekeimten und nicht gekeimten Pollenkörner auszuzählen. Verwendet wurde das Programm Motic Images Plus 3.0, mithilfe des Programms wurden die Bilder mit einem Gitternetz unterteilt. Für die Auswertung wurden die Pollen von immer denselben neun Quadraten des Gitternetzes von insgesamt vier Fotos pro Sorte bzw. Topf gezählt. Die Pollen auf der rechten und unteren Linie wurden immer beim jeweiligen Quadrat mitgezählt, Pollen auf der oberen und linken Linie mussten dementsprechend ignoriert werden. Als gekeimt wurden solche Pollenkörner gezählt, deren Pollenschlauch den Durchmesser des Pollenkorns überschritten hatten (Baby et al. 2016; Alva et al. 2015). Der Anteil in Prozent der gekeimten Pollenkörner an der Gesamtzahl Pollen pro Foto wurde ermittelt. Da der Pollen nicht abgewogen wurde, handelt es sich um Näherungswerte und keine absoluten Zahlen.

3.2.2 Untersuchung Pollenlebensfähigkeit mittels Alexanderlösung

Für die Überprüfung der Pollenlebensfähigkeit mittels Alexanderlösung wurden die toten und lebenden Pollen mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Zuerst wurden jeweils 50µl Alexanderlösung mit einer 200 µl Pipette (Firma Gilson) in zwei Vertiefungen einer 96er Companion-Platte (Firma Falcon) verteilt. In die Vertiefungen konnten jeweils eine Spatelspitze Pollen gegeben werden. Da die Alexanderlösung einige Zeit benötigt, um zu

wirken, wurden die Platten für 10 Minuten stehen gelassen. Währenddessen konnte die Neubauer Zählkammer vorbereitet werden. Die Neubauer Zählkammer hat eine Kammertiefe von 0,100 mm und eine Fläche von 0,0025 mm² der Kleinstquadrate. Um das Deckglas auf die Zählkammer zu bringen, mussten die beiden Stege leicht befeuchtet werden. Dann wurde das Deckglas mit leichtem Druck auf den Stegen hoch und runter bewegt, bis die Newton'schen Ringe zu sehen waren, was bedeutete, dass das Glas hält.

Vor dem Befüllen der Zählkammer wurde die Lösung mit der Pipette resuspendiert. Zum Befüllen der Zählkammer musste die Pipettenspitze am Rand des Deckglases angesetzt und die Lösung langsam eingefüllt werden. In jede Zählkammer wurden 10 µl der Alexanderlösung mit dem Pollen gegeben. Mit dem 40er Objektiv des Mikroskops der Firma hund wurde mikroskopiert. Um das Zählen zu erleichtern wurde ein manueller Zähler mit zwei Zählern zur Hilfe genommen.

Beim Zählen musste darauf geachtet werden, immer die Pollenkörner auf denselben Linien für ein Feld mitzuzählen. Es wurden also immer die Pollen, die sich auf der unteren und rechten Linie befanden, zum aktuellen Feld dazugezählt. Um den menschlichen Fehler zu verringern, wurde jede Kammer zwei Mal gezählt. Pro Kammer wurden 16 Großquadrate gezählt. Da keine Verdünnungsfaktoren verwendet wurden, wurden keine Zellzahlen pro Volumen errechnet. Die Mittelwerte der fertilen Pollenkörner pro Kammer und Zählung wurden errechnet, umso einen Mittelwert über beide Zählungen zu ermitteln.

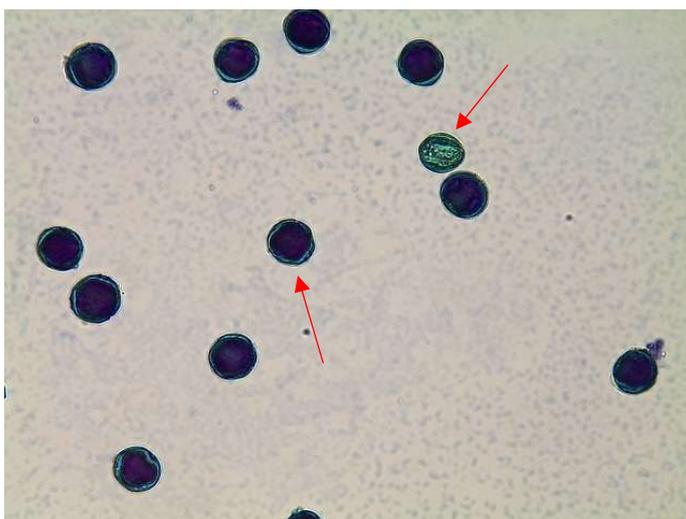


Abbildung 8: Mikroskop-Aufnahme: Anfärbung von Pollen mittels Alexanderlösung. Die lila gefärbten Pollen sind lebend, während das türkise Pollenkorn tot ist.

Aufgrund des hohen Zeitaufwands der Zählkammer wurde im weiteren Versuchsverlauf die Pollenlebensfähigkeit mittels Alexanderlösung durch Fotoaufnahmen ermittelt (vgl. Abb.8). Dafür wurde mit dem Institut für Phytomedizin der Hochschule Geisenheim zusammengearbeitet, da hier ein Kamerasystem für Aufnahmen mit dem Mikroskop vorhanden ist.

Es wurden 50 µl Alexanderlösung mit einer 200 µl Pipette (Firma Gilson) in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gefüllt und verschlossen. Im Institut für Phytomedizin wurde dann im Labor eine Spatelspitze Pollen aus dem Rollrandglas in das Eppendorf Tube gegeben und mit der 200 µl Pipette suspendiert. Anschließend wurde 1 µl der Alexanderlösung mit Pollen auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas abgedeckt. Damit das Färbemittel wirken kann, musste 10 Minuten gewartet werden, bevor mit dem Mikroskopieren begonnen werden konnte. Es wurde ein Leica Mikroskop mit dem 40er Objektiv verwendet. Das Mikroskop wurde an ein Leica Kamera System angeschlossen und mit dem Leica Fotoprogramm wurden jeweils zwölf Ausschnitte zum Auswerten pro Sorte fotografiert, wie auch bei PADUREANU UND PATRAS (2018). Schließlich wurde der Anteil in Prozent der lebenden Pollenkörner an der Gesamtzahl an Pollenkörnern pro Foto ermittelt.

3.2.3 IFC Analyse – Kooperation mit Acepo

Zusätzlich zu den Untersuchungen in Geisenheim wurde mit Iris Heidmann von der Firma Acepo in den Niederlanden kooperiert, Frau Heidmann hat sich auf Pollenanalysen spezialisiert.

Von jeder Sorte wurde eine Pollenprobe am Tag der Ernte in die Niederlande geschickt, dort wurde die Lebensfähigkeit der Pollen mittels Durchflusszytometrie (IFC) überprüft. Es wurde versucht die eigenen Untersuchungen mit der Alexanderfärbung in etwa zur selben Zeit zu machen bzw. eine zeitgleiche Wiederholung durchzuführen. Da jedoch das Institut für Phytomedizin am Wochenende z. B. geschlossen war, konnte es nicht immer gewährleistet werden. In der Regel lagen null bis zwei Tage zwischen den Versuchen, nur bei der Sorte Riesling waren es vier Tage.

3.3 Untersuchungen an Beeren und Samen

3.3.1 Reproduktive Parameter

Bei optischer Vollreife, wenn das Stielgerüst anfängt zu verholzen, wurden drei Trauben geerntet und auf folgende reproduktive Parameter untersucht:

- Gesamtanzahl Beeren pro Traube
- Anzahl grüne, lebende Fruchtknoten
- Anzahl samenhaltige Beeren pro Traube
- Anzahl samenlose Beeren pro Traube
- Gesamtanzahl Kerne pro Traube
- Durchschnittliche Kern Anzahl pro Beere (Durchschnitt von zehn Beeren)

Dafür wurden alle Beeren vom Stielgerüst abgezupft, sortiert und gezählt. Als erstes wurden zehn Beeren zufällig ausgewählt, deren Kerne isoliert und die Kernanzahl pro Beere notiert. Dann wurden alle Kerne aus jeder Beere herausgeholt, in einem Sieb unter fließendem Wasser gewaschen und auf Papiertüchern abgerieben und erneut unter Wasser gewaschen, bis kein Fruchtfleisch mehr an den Samen haftete. Dann wurden die Kerne in einem Honigglas gesammelt und die Gesamtanzahl der Kerne gezählt. Als kernlos wurden solche Beeren gezählt, die keine bzw. nur rudimentäre Kerne enthielten (vgl. Abb. 9).



Abbildung 9: Links unterschiedliche Beerengrößen inklusive grünem, lebendem Fruchtknoten und rechts drei rudimentäre Kerne im Vergleich zu einem normal entwickelten Samen.

Mithilfe der erfassten Parameter konnte der Millerandage Index ermittelt werden, welcher beschreibt, wie hoch der Anteil an samenlosen Beeren oder grünen Fruchtknoten in einer Traube ist. Je höher der Wert, desto größer ist der Anteil. Der Millerandage Index berechnet sich folgendermaßen (Dry et al. 2010):

$$10 - \left\{ \frac{(\text{Anzahl samenhaltige Beeren} \times 10)}{(\text{Anzahl samenhaltige Beeren} + \text{samense Beeren} + \text{grüne Fruchtknoten})} \right\}$$

Außerdem wurde die Fruchtbarkeitsrate pro Traube wie folgt berechnet, dabei wird von vier Samenanlagen pro Fruchtknoten ausgegangen (Kliwer 1977):

$$\frac{\text{Gesamtzahl Kerne pro Traube}}{\text{Gesamtanzahl Samenanlage pro Traube}}$$

Beim Topfversuch wurde zusätzlich der Coulure-Index, d.h. der Verrieselungs-Index berechnet, dies war aufgrund der gezählten Blüten möglich. Außerdem konnte hier der Fruchtansatz in % ermittelt werden. Der Coulure-Index berechnet sich folgendermaßen (Dry et al. 2010):

$$10 - \left\{ \frac{(\text{Anzahl samenhaltige Beeren} + \text{samense Beeren} + \text{grüne Fruchtknoten}) \times 10}{\text{Anzahl Blüten}} \right\}$$

Die Anzahl der Beeren, Fruchtknoten und Blüten bezieht sich dabei immer auf eine Traube bzw. eine Infloreszenz. Der Fruchtansatz in Prozent wird folgendermaßen berechnet (Dry et al. 2010):

$$\left(\frac{\text{Gesamtbeerenanzahl pro Traube}}{\text{Anzahl der Blüten pro Infloreszenz}} \right) \times 100$$

3.3.2 Schwimmprobe

Für die Schwimmprobe wurde das Honigglas mit den Kernen mit destilliertem Wasser aufgefüllt und für 30 Minuten darin belassen. Bei dieser Untersuchung lassen sich normal entwickelte Samen von den nicht normal ausgebildeten Samen unterscheiden. Die normal entwickelten Samen sind schwerer und sinken zu Boden, während die anderen an der Oberfläche schwimmen. So können nicht keimungsfähige Samen schnell aussortiert werden (Lott 1969).

Nach 30 Minuten konnten die Schwimmer und Nichtschwimmer separiert und gezählt werden. Um die Kerne vor Pilzbefall zu schützen, wurden alle Kerne in einer 2,4%igen Natriumhypochlorid Lösung desinfiziert. Dafür wurden die Kerne für 30 Minuten in der

Natriumhypochlorid Lösung in einem 50 ml CryoPure Röhrchen der Firma Sarstedt belassen, dann zwei Mal für jeweils 20 Minuten im Honigglas in sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Die Kerne wurden danach in offenen Petrischalen auf Filterpapier zum Trocknen platziert. Nach einem 24 Stunden Trocknungsprozess wurden die Petrischalen mit den Samen geschlossen.

3.3.3 Tetrazolium Test

Am darauffolgenden Tag wurden die Kerne für 24 Stunden im Honigglas in Leitungswasser gewässert. Nach dem Wässern sind die Kerne bereit für das Aufschneiden und die Analyse mittels TZ Färbung (Elias et al. 2012).

Pro Sorte wurden von den Nichtschwimmer Kernen so viele aufgeschnitten, dass 3x12 Kerne gefärbt und somit 3x10 Embryonen ausgewertet werden konnten, da es mal passieren kann, dass der Embryo herausfällt. Standen nur wenige Kerne zum Aufschneiden zur Verfügung, wurden alle Samen aufgeschnitten und die maximale Anzahl an Embryonen gefärbt. Der



Abbildung 10: Arbeitsplatz und Arbeitsutensilien, Aufschneiden der Kerne.

Schnitt erfolgte längs, beginnen sollte man am Schnabel des Samens, wo der Embryo liegt. Dafür wurde ein Skalpell der Größe 11 verwendet. Fixiert wird der Kern mit einer Pinzette, als Unterlage eignet sich ein Schneidebrett (vgl. Abb. 10). Der Samen wurde möglichst nicht ganz durchgeschnitten, damit man ihn wieder zuklappen konnte, um das Risiko zu verringern, dass der Embryo herausfällt.

Tabelle 1: Schema zur Beurteilung der TTC Färbung. Modifiziert nach Evaluierungs-Beispielen von (Leist und Krämer 2003)

Färbung	Beurteilung
Endosperm und Embryo 100% rot	Lebender Samen
Endosperm oder Embryo 100% weiß, Endosperm weiß und Embryo rot	Toter Samen
Embryo teils rot, teils weiß	Abnormaler Samen

Die aufgeschnittenen Kerne wurden in einer 24er Companion-Platte der Firma Falcon platziert, jeweils sechs Stück pro Vertiefung. Dann wurden pro Vertiefung 1000 µl 0,5%ige TTC Lösung mit einer 1000 µl Pipette (Firma Nichiryo) zupipettiert. Die Platten wurden für zwei Stunden im Wärmeschrank der Firma Memmert bei 40°C gelassen (Elias et al. 2012; Conner 2008). Danach wurden die gefärbten Kerne mit der MotiCam Kamera und dem Programm Motic Images Plus 3.0 unter dem Binokular Wild M3 der Firma Herbrugg fotografiert und wie in Tabelle 1 ausgewertet. Beispiele für die Färbung und Auswertung der Samen befinden sich in Abbildung 11.

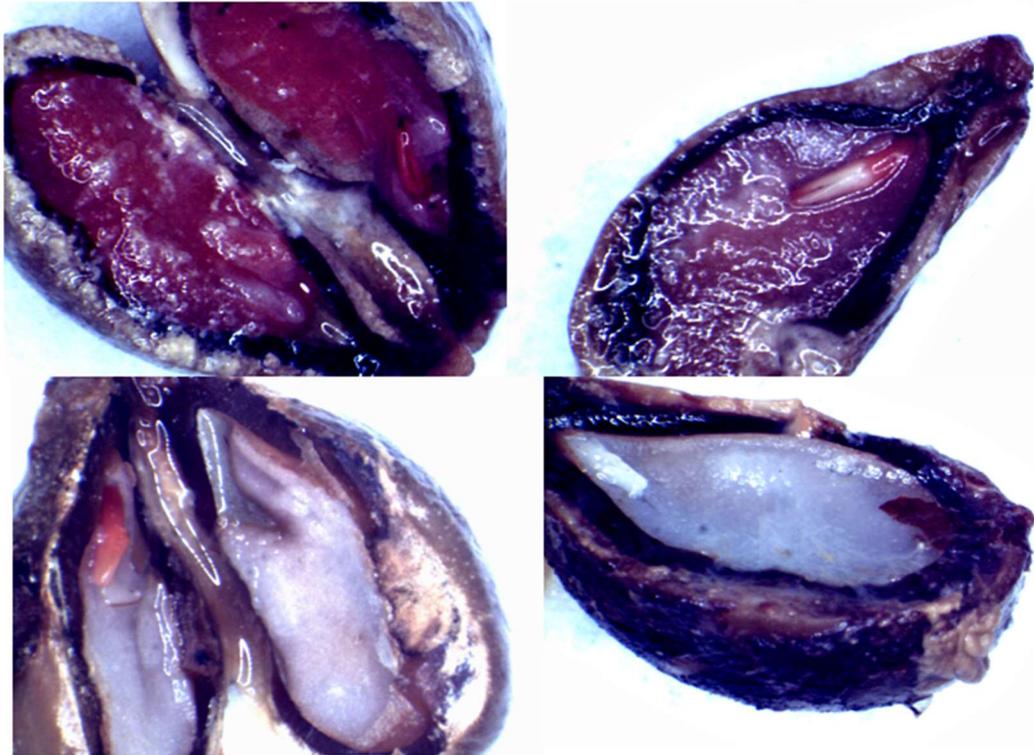


Abbildung 11: TTC Färbung der Kerne. Lebender Samen mit rotem Endosperm und rotem Embryo (l.o.). Abnormaler Samen mit rotem Endosperm und teilweise rotem und weißem Embryo (r.o.). Toter Samen mit rotem Embryo und weißem Endosperm (l.u.). Toter Samen mit weißem Embryo und weißem Endosperm (r.u.).

3.4 Sorten Pollenuntersuchungen und Kernuntersuchungen

Um gängige Methoden zur Pollenlebensfähigkeit und Pollenkeimungsfähigkeit zu überprüfen (vgl. Abschnitt 3.2), wurde Pollen verschiedener Sorten geerntet und getestet. Die Rebsorten stehen auf den Parzellen des Instituts für Rebenzüchtung der Hochschule Geisenheim. Zusätzlich wurde der Pollen verschiedener Geisenheimer Spätburgunder Klone untersucht. Die Fragestellung lautete in dem Fall, ob sich die Pollenvitalität der Klone unterscheidet und damit zu einer unterschiedlichen Traubenstruktur führt. Daher wurden die Pinot Noir Klone ebenfalls auf verschiedene reproduktive Parameter untersucht und die Samen mit TTC gefärbt (vgl. Punkt 3.3.3).

Die verschiedenen Sorten, Klone, Standorte sowie die verwendeten Abkürzungen lassen sich Tabelle 2 entnehmen.

Tabelle 2: Untersuchte Spätburgunder Klone und Sorten. Standort am Institut für Rebenzüchtung der Hochschule Geisenheim sowie die verwendete Abkürzung.

Sorte	Klon	Standort	Abkürzung
Spätburgunder Klone	a=20-16 Gm=kleinbeerig	G-1-15-3	PNa
	b=18-31 Gm=kompakt	O-2-13-1	PNb
	c=20-13-28-8 Gm=kleinbeerig	B-1-9-3	PNc
	d=2-6-41 Gm=aufrecht	B-1-12-3	PNd
	e=1-47-36 Gm=lockerbeerig	O-2-6-1	PNe
Cabernet Sauvignon	169 INRA	M-2-5-5	CS
Grüner Veltliner	/	M-1-18-5	GV
Syrah	877 INRA	M-1-7-5	SY

3.5 Topfrebenversuch

3.5.1 Aufbau

Für den Temperaturversuch wurden dreijährige, auf Börner gepfropfte Reben zunächst bei 15-20°C zum Austrieb gebracht, um sie dann für sechs Wochen ab Blühbeginn bei unterschiedlichen Temperaturen zu belassen. Insgesamt wurden zwölf frisch getopfte Reben am 17.03.2020 im Gewächshaus Zwei bei moderaten Temperaturen (15-20°C) untergebracht. Vier weitere Topfreben wurden von Anfang an im Freiland belassen, im weiteren Verlauf wurden zwei der vier Töpfe aussortiert.

Die Topfreben wurden bis kurz vor Blühbeginn, wenn die Einzelblüten beginnen sich abzuspreizen (ES57), in den moderaten Temperaturen belassen. Am 17.04.2020 wurde ein Topf ins Freiland gebracht und vier Töpfe wurden in das Gewächshaus Elf gebracht, wo deutlich höhere Temperaturen um die 32°C sowie eine hohe Luftfeuchtigkeit durch

Sprekleranlagen herrschten. Vier Topfreben blieben im Gewächshaus Zwei in den moderaten Temperaturen. Die Topfgruppen wurden so zusammengestellt, dass alle etwa das gleiche Entwicklungsstadium hatten, da manche Reben dem Blühbeginn noch etwas näher waren als andere. Die übrigen zwei Töpfe, die nicht so gut ausgetrieben waren oder einen zu geringen Gescheinansatz zeigten, wurden aussortiert. Die Töpfe in Gewächshaus Zwei und im Freiland wurden regelmäßig gegossen, im Gewächshaus Elf erfolgte die Bewässerung regelmäßig durch Beregnung von oben mit Sprekleranlagen.

Die Temperaturen wurden mithilfe von USB-Datenloggern der Firma PeakTech aufgezeichnet. Das Modell 5185 zeichnet Temperatur sowie Luftfeuchtigkeit auf. Pro Variante wurde ein Datenlogger installiert, sodass der Sensor möglichst zwischen den Töpfen die Temperatur aufzeichnen konnte. Der Temperaturlogger im Freiland zeichnete nachts immer kurzzeitig dieselbe Temperatur von $-0,2^{\circ}\text{C}$ auf, es scheint eine Störung aufgetreten zu sein. Deshalb wurden für die Freilandvariante zusätzlich die Wetterdaten der Wetterstation Geisenheim zu Hilfe genommen.

Am 28.04. musste eine Mitschurinski Topfrebe aufgrund von Reblausbefall aus dem Versuch genommen werden.

Der Versuchsaufbau und die Sortenverteilung lassen sich Abbildung 12 entnehmen.

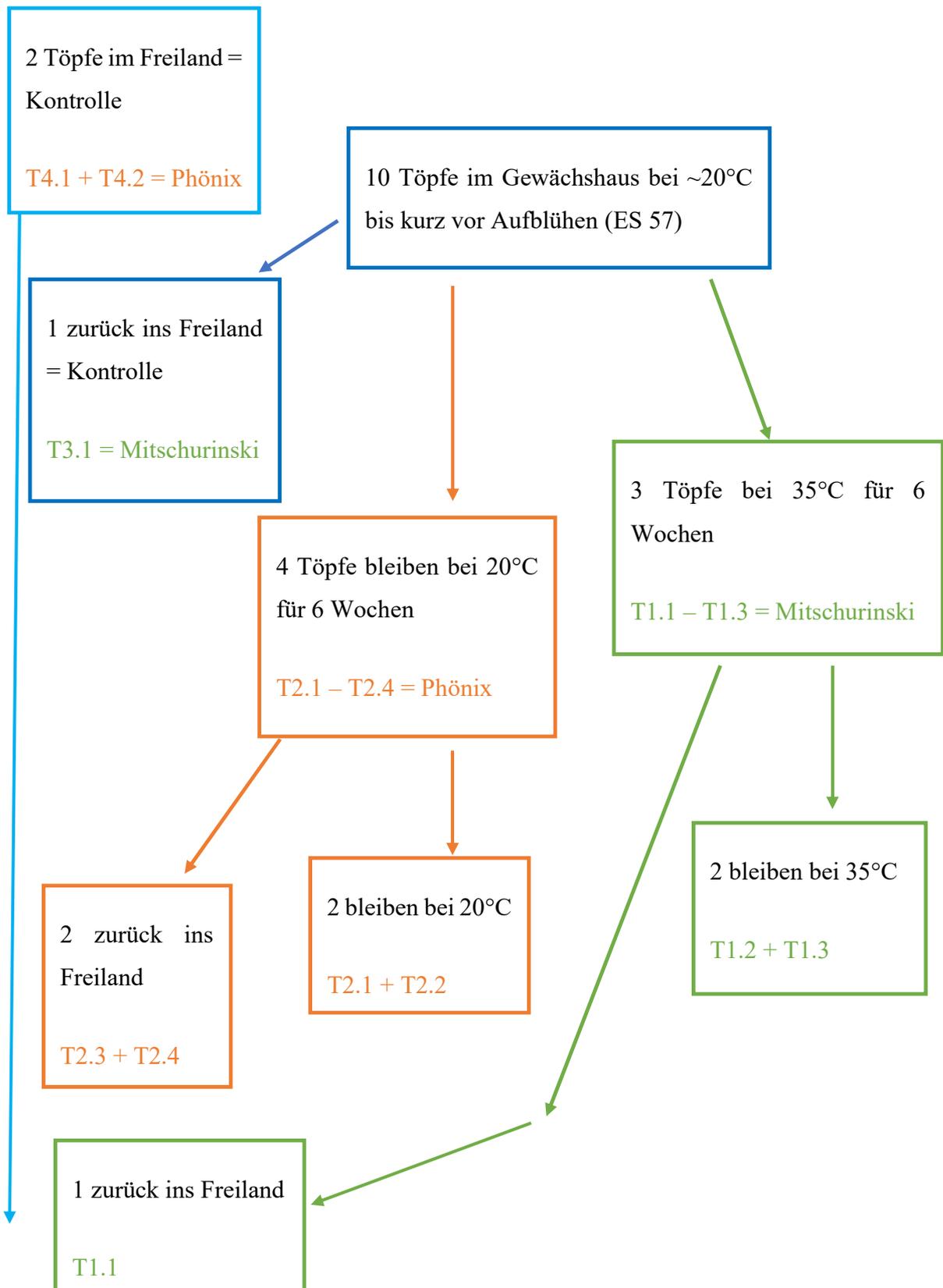


Abbildung 12: Versuchsaufbau des Topfrebenversuches.

Die Töpfe wurden für sechs Wochen ab Blühbeginn in den jeweiligen Temperaturen belassen. Von der moderaten Variante wurden nach Ablauf der sechs Wochen zwei Töpfe (6.06.2020) und von der warmen Variante ein Topf ins Freiland gebracht (1.06.2020), während die anderen zwei Töpfe jeweils in den Temperaturen belassen wurden. Die zwei Topfreben, die von Anfang an im Freiland waren, dienten als Kontrolle. Es wurde zufällig ausgewählt, welche von den Töpfen nach der Blüte im Gewächshaus blieben, bzw. welche ins Freiland kamen.

Um die Verständlichkeit und Lesbarkeit im weiteren Verlauf zu gewährleisten, wurden den Töpfen Nummerierungen gegeben, die darauf hinweisen, in welchen Temperaturen diese sich befanden. Die Aufschlüsselung gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Nummerierung der Topfreben und Zuweisung der jeweiligen Temperaturvariante und Sorte. T steht für Topfrebe.

Nummerierung	Bedeutung	Sorte
T1.1	Ab ES 57 6 Wochen bei 32°C, dann im Freiland	Mitschurinski
T1.2	Ab ES 57 bei 32°C	Mitschurinski
T1.3	Ab ES 57 bei 32°C	Mitschurinski
T2.1	Ab ES 57 bei 20°C	Phönix
T2.2	Ab ES 57 bei 20°C	Phönix
T2.3	Ab ES 57 6 Wochen bei 20°C, dann im Freiland	Phönix
T2.4	Ab ES 57 6 Wochen bei 20°C, dann im Freiland	Phönix
T3.1	Ab ES 57 im Freiland	Mitschurinski
T4.1	Ab Austrieb im Freiland	Phönix
T4.2	Ab Austrieb im Freiland	Phönix

Der Ausgangspunkt des Versuches war alle Untersuchungen an Riesling durchzuführen. Im Laufe des Austriebs haben sich jedoch ampelografische Unterschiede zwischen den Topfreben herausgestellt. Nach einer DNA-Analyse durch das Institut für Rebenzüchtung sind die Sorten Phönix und Mitschurinski ermittelt worden. Der Versuch wurde mit den zwei Sorten weitergeführt, da die Phänologie schon zu weit fortgeschritten war, um den

Versuchsaufbau zu ändern. Untersucht und verglichen wurden schließlich die Phönix Töpfe untereinander und die Mitschurinski Töpfe untereinander.



Abbildung 13: Austrieb der Topfreben im Gewächshaus und eingensetzte Phönix Trauben im moderaten Gewächshaus.

Gegipfelt wurden alle Topfreben, wenn sie das Entwicklungsstadium (ES) 73-75 erreicht hatten. Kurz vor dem Weichwerden der Beeren wurden die Trauben außerdem eingensetzt, um sie gegen Vogel- und Wespenfraß zu schützen (vgl. Abb. 13).

Als weitere Kontrolle für die Untersuchung der reproduktiven Parameter und der Samenvitalität der Mitschurinski Topfreben, hat das Julius-Kühn-Institut (JKI) drei Trauben per Post geschickt. Somit sollte ausgeschlossen werden eine unterschiedliche Traubenstruktur auf die Temperaturvariante zurückzuführen, obwohl es sich um eine Sortentypizität handelt.

3.5.2 Erfasste Parameter

Von jedem Topf wurden drei Gescheine ausgewählt und mit einem Draht markiert. Diese Gescheine wurden genau beobachtet und später im Jahr reproduktive Parameter sowie die Samen untersucht. Es wurden immer jeweils Gescheine an drei verschiedenen Insertionshöhen gewählt: Ein Geschein an der Basis, eins in der Mitte des Triebes und ein Geschein an der Triebspitze. Von diesen drei Gescheinen wurden die Einzelblüten händisch gezählt.

3.5.3 Bonitur der Phänologie

Die phänologische Entwicklung der Topfreben wurde vom Austrieb bis zum Fruchtansatz mit der BBCH Skala bonitiert (Lorenz et al. 1994). Besonderes Augenmerk lag auf dem Zeitraum der Blüte.

Am Anfang des Austriebs wurde zwei Mal in der Woche bonitiert, im weiteren Verlauf bis zur Blüte reichte einmal die Woche aus, da die Entwicklungsgeschwindigkeit nicht mehr so hoch war. Während der Blüte wurde dann einmal am Tag bonitiert, weil die Blüte bei guten Witterungsbedingungen sehr schnell ablaufen kann.

3.6 Statistische Analyse

Die Daten wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft. Da es sich in allen Fällen um weitestgehend nicht normalverteilte Daten handelt und es sich um unabhängige Stichproben handelt, wurde im nächsten Schritt der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser Test ist ein nichtparametrischer und robuster Test, der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt. Der Kruskal-Wallis-Test überprüft, ob es einen Unterschied in der zentralen Tendenz gibt (Schwarz et al. 2020). Wurde ein Unterschied durch den Kruskal-Wallis-Test ermittelt, musste ein Post-hoc-Test durchgeführt werden, um feststellen zu können, zwischen welchen Varianten ein signifikanter Unterschied besteht. Als Post-hoc-Test wurde der Dunn-Bonferroni-Test gewählt. Bei beiden Tests wurde ein Signifikanzniveau von 95% ($p < 0,05$) festgelegt. Beim Dunn-Bonferroni-Test wurde der unkorrigierte p-Wert gewählt, da der mittels Bonferroni-Korrektur korrigierte p-Wert die strengste und konservativste Methode darstellt (Hemmerich 2021). In vielen Fällen führte dies dazu, dass der Kruskal-Wallis-Test einen Unterschied feststellte, aber der Dunn-Bonferroni-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen Varianten ermitteln konnte. Die genauen p-Werte der drei durchgeführten statistischen Tests befinden sich in einer Tabelle im Anhang. Die Datenaufbereitung und die Erstellung einfacher Diagramme erfolgte durch Microsoft Excel Version 2104. Für alle statistischen Analysen und die Erstellung der Box-Whisker-Plots wurde das Programm R der Version 4.0.5 mit R-Studio und dem R-Commander benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Sortenversuch

4.1.1 Pollenlebensfähigkeit

Vergleich der Methoden: Alexanderfärbung und IFC

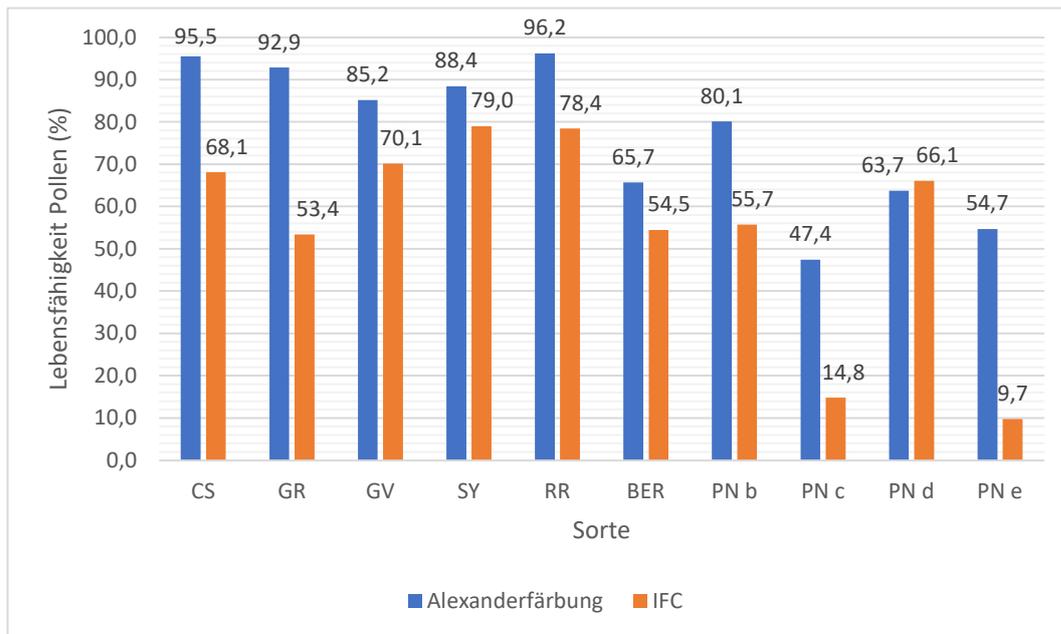


Abbildung 14: Vergleich der Lebensfähigkeit der Pollen in %, ermittelt durch die Methoden der Alexanderfärbung in Geisenheim (Gm) und durch die IFC in den Niederlanden. Die Daten der Alexanderfärbung stellen den Mittelwert von zwölf Wiederholungen dar. CS=Cabernet Sauvignon, GR=Grenache, GV=Grüner Veltliner, SY=Syrah, RR=Riesling, BER=*Vitis berlandieri*, PNb=kompakter Pinot Noir Klon, PNc=kleinbeeriger Pinot Noir Klon, PNd=aufrechter Pinot Noir Klon, PNe=lockerbeeriger Pinot Noir Klon

In Abbildung 14 lässt sich erkennen, dass die Werte der Lebensfähigkeit in % der Alexanderfärbung bei allen Sorten höher liegen als die der IFC. Ausnahme ist der aufrechte Pinot Noir Klon (PNd), hier liegen die Ergebnisse sehr nah beieinander. Die IFC liefert eine Lebensfähigkeit von 66,1 % für den aufrechten Klon, die Alexanderfärbung eine Lebensfähigkeit von 63,7 %. Die Alexanderfärbung liefert drei Ergebnisse über 90%: für Cabernet Sauvignon liegt die Lebensfähigkeit der Pollen bei 95,5%, für Grenache bei 92,9% und für Riesling bei 96,2%. Die höchste Lebensfähigkeit in %, die die IFC ermittelt hat, ist 79% bei der Sorte Syrah. Die geringste Lebensfähigkeitsrate, die die IFC ausmachen konnte, ist 9,74% beim lockerbeerigen Pinot Noir Klon (PNe). Die geringste Lebensfähigkeit in %,

die die Alexanderfärbung liefert ist 47,4% beim kleinbeerigen Pinot Noir Klon (PNc), hier zeigt die IFC ebenfalls eine geringe Lebensfähigkeit von 14,8%.

4.1.2 Pollenkeimungsfähigkeit

Welche Zuckerkonzentration eignet sich am besten für die *in vitro* Keimung?

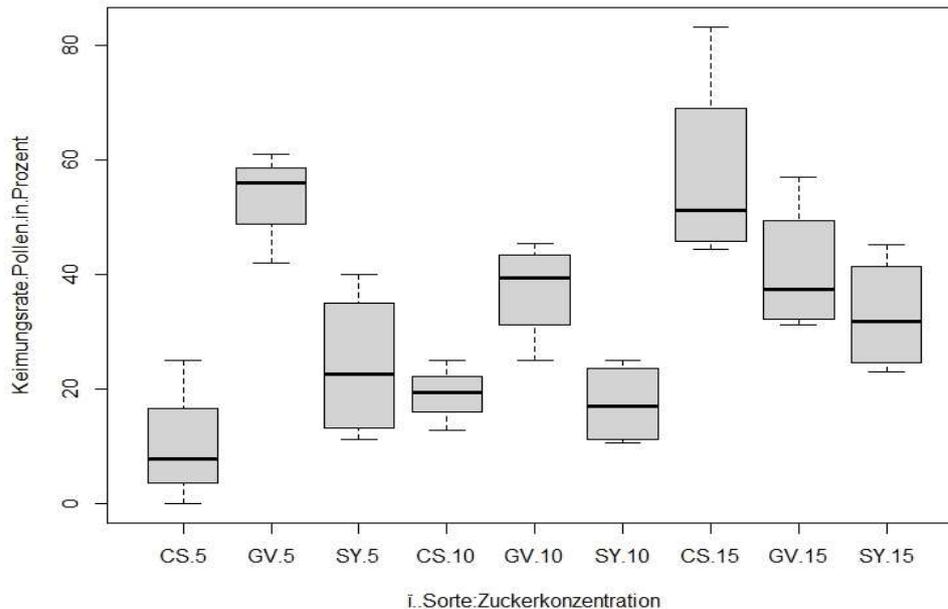


Abbildung 15: Keimungsrate der Pollen (%) bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen und Rebsorten. Gruppiertes Boxplot mit den drei Sorten Cabernet Sauvignon (CS), Grüner Veltliner (GV) und Syrah (SY) sowie drei verschiedenen Saccharosekonzentrationen: 5%, 10% und 15%. Keimungsrate der Pollen (%) sind Werte von vier Wiederholungen.

Abbildung 15 zeigt, dass bei 5% und 10% Zucker die Pollenkeimungsrate der Sorte Grüner Veltliner höher ist als die der anderen zwei Sorten. Bei der 5%igen Saccharoselösung beträgt der Median beim Grünen Veltliner 52%, bei Cabernet Sauvignon 12% und bei Syrah 23%. Bei der 10%igen Zuckerlösung beträgt der Median beim Grünen Veltliner 34% im Gegensatz zu 19% (Cabernet Sauvignon) und 17% (Syrah). Bei der 15%igen Zuckerlösung liegen die Mediane aller drei Sorten näher aneinander als bei den anderen zwei Zuckerkonzentrationen. Der Median, der bei 15% am höchsten liegt, ist der von Cabernet Sauvignon mit 51%. Die Box oberhalb des Medians ist dabei wesentlich größer, mit einem Maximum Wert von 83%. Die Mediane der Sorten Cabernet Sauvignon und Syrah liegen bei der 15%igen Zuckerlösung am höchsten (51% und 32%). Die kleinste Box zeigt sich bei der Sorte Cabernet Sauvignon bei einer Zuckerkonzentration von 10%. Hier ist die gesamte

Box sowie die Whisker sehr klein und der Median liegt mit 19% genau in der Mitte der beiden Quartile.

Der Kruskal-Wallis-Test ergab für die Zuckerkonzentrationen 5% und 10% einen Unterschied in der zentralen Tendenz ($p < 0,05$). Für die 15%ige Zuckerlösung konnte kein Unterschied festgestellt werden. Der anschließende Dunn-Bonferroni-Test ergab, dass die Pollenkeimungsrate des Grünen Veltliner bei der 5%igen Saccharoselösung sehr signifikant höher war als die von Cabernet Sauvignon ($p < 0,01$). Bei einer Zuckerkonzentration von 10% war die Pollenkeimungsrate der Sorte Grüner Veltliner signifikant höher als die der Sorten Syrah und Cabernet Sauvignon ($p < 0,05$).

Bessere Keimung der Pollen *in vitro*, wenn dem Keimungsmedium Borsäure zugesetzt ist?

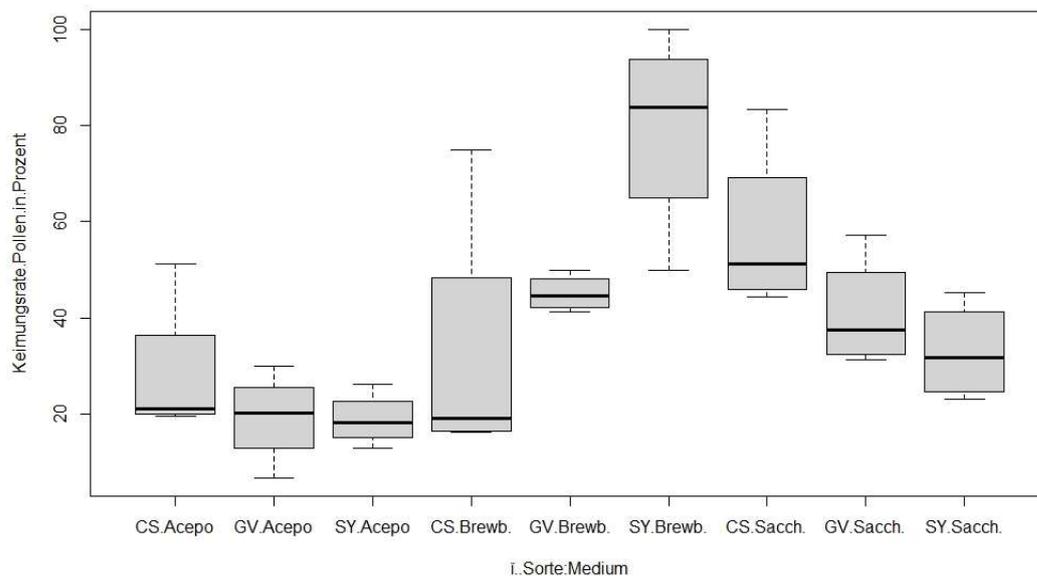


Abbildung 16: Keimungsrate der Pollen (%) bei verschiedenen Keimungsmedien und Rebsorten. Gruppieretes Boxplot mit den drei Sorten Cabernet Sauvignon (CS), Grüner Veltliner (GV) und Syrah (SY) sowie drei verschiedenen Keimungsmedien. Acepo Medium (mit Borsäure), Brewbaker Medium (mit Borsäure) und 15%ige Saccharoselösung. Keimungsrate der Pollen (%) sind Werte von vier Wiederholungen.

Abbildung 16 zeigt, dass die Mediane aller drei Sorten bei dem Acepo Medium sehr niedrig liegen, außerdem liegen sie hier fast alle auf derselben Höhe: 21% (Cabernet Sauvignon), 20% (Grüner Veltliner) und 18% (Syrah). Für Cabernet Sauvignon ist die Box oberhalb des Medians beim Acepo Medium wesentlich größer als unter dem Median. Der Median von Cabernet Sauvignon liegt beim Brewbaker Medium mit 19% in etwa auf gleicher Höhe wie beim Acepo Medium. Auffallend ist der große Interquartilsabstand sowie der hohe

Maximum Wert, die Box ist oberhalb des Medians sehr groß. Der Maximum Wert für Cabernet Sauvignon beim Brewbaker Medium beträgt 75% und liegt damit weit entfernt vom Median. Für die Sorte Syrah liegt der Median mit 84% beim Brewbaker Medium am höchsten. Die Box ist jedoch groß, auch der Whisker des Minimum Wertes ist sehr groß. So liegt der Minimum Wert bei 50% und der Maximum Wert bei 100% Keimungsrate. Beim Brewbaker Medium zeigen sich bei den Sorten die größten Unterschiede zwischen den Box-Whisker-Plots. Bei der 15%igen Zuckerlösung liegen die Mediane der Sorten bei 51% (Cabernet Sauvignon), 38% (Grüner Veltliner) und 32% (Syrah).

Der Kruskal-Wallis-Test ergab für das Acepo Medium sowie die 15%ige Zuckerlösung keinen Unterschied zwischen den Sorten. Beim Brewbaker Medium konnte ein Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen den Rebsorten festgestellt werden ($p < 0,05$). Der Dunn-Bonferroni-Test ergab eine signifikant höhere Pollenkeimungsrate ($p < 0,05$) für die Sorte Syrah im Gegensatz zur Sorte Cabernet Sauvignon.

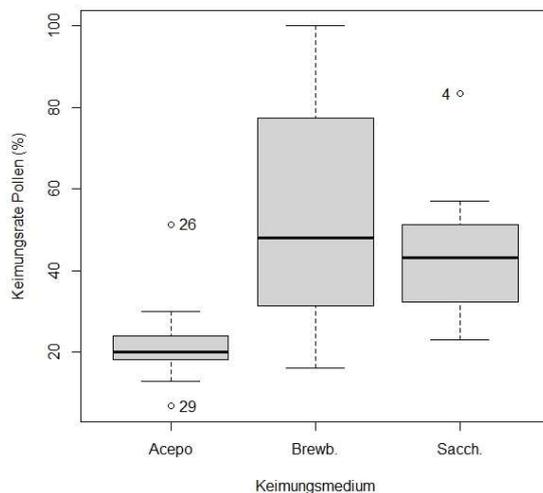


Abbildung 17: Keimungsrate der Pollen in % bei verschiedenen Keimungsmedien. Mittelwert von vier Wiederholungen von drei Sorten (Cabernet Sauvignon, Syrah, Grüner Veltliner). Vergleich *in vitro* Keimung zweier Borsäurehaltiger Medien (Acepo und Brewbaker) mit einer 15%igen Saccharoselösung.

Abbildung 17 zeigt nochmal die Verteilung der Daten für die Keimungsrate der Pollen in % zusammenfassend für die drei verschiedenen Medien, ohne Fokus auf die Sorten. Beim Acepo Medium ist die Box am kleinsten, der Interquartilsabstand ist sehr gering. Es gibt jedoch einen Ausreißer nach oben und einen Ausreißer nach unten. Der Median für das Acepo Medium liegt bei 20%. Die Ausreißer liegen bei 7% und 51%. Im Gegensatz dazu, zeigt sich beim Brewbaker Medium eine sehr große Box mit großen Interquartilsabständen

und zwei langen Whiskern. Der Median beträgt beim Brewbaker Medium 48%. Der Minimum Wert beträgt 16%, der Maximum Wert beträgt 100%. Der Median der Keimungsraten in der Zuckerlösung liegt mit 43% in etwa auf der Höhe des Brewbakers Medium, jedoch sind die Interquartilsabstände und die Whisker kleiner. Auch hier gibt es einen Ausreißer nach oben. Der Ausreißer liegt bei 83%.

Der Kruskal-Wallis-Test konnte einen Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen den drei verschiedenen Medien feststellen ($p < 0,05$). Die Pollenkeimungsraten beim Verwenden des Acepo Mediums waren sehr signifikant geringer als die Pollenkeimungsraten beim Brewbaker Medium sowie bei der Zuckerlösung ($p < 0,01$).

4.2 Vergleich der Pinot Noir Klone

4.2.1 Vergleich von Lebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit

Unterscheiden sich die Pollen der Spätburgunder Klone bezüglich ihrer Lebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit?

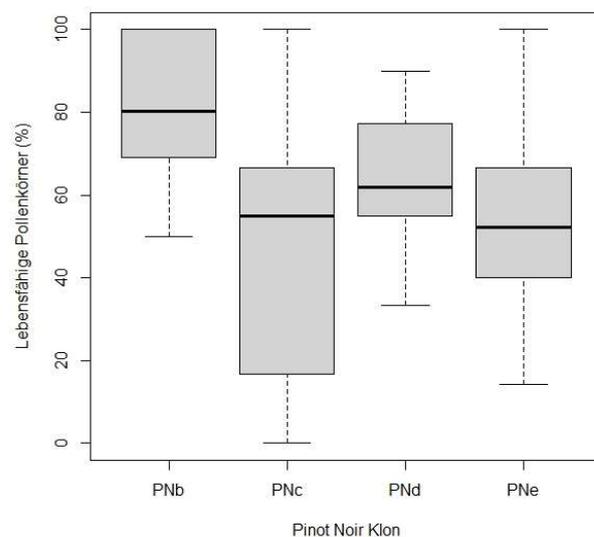


Abbildung 18: Lebensfähige Pollen in %. Werte von zwölf Wiederholungen. PNa = kleinbeeriger Klon: nicht getestet (n.t.), PNB= kompakter Klon, PNC=kleinbeeriger Klon, PND= aufrechter Klon, PNE=lockerbeeriger Klon

Der Box-Whisker-Plot des kleinbeerigen Spätburgunder Klons (PNc) zeigt sehr große Interquartilsabstände, auch die Maximum- und Minimum Werte liegen sehr weit auseinander (vgl. Abb. 18). So liegt der Minimum Wert bei 0% lebenden Pollen und der Maximum Wert bei 100% lebende Pollen. Das untere Quartil ist deutlich länger, der Median liegt bei 55% Lebensfähigkeit. Auch beim lockerbeerigen Klon (PNe) liegen die Maximum- und Minimum Werte sehr weit auseinander. Der Minimum Wert beträgt 14%, der Maximum Wert beträgt ebenfalls 100%. Hier sind jedoch die Interquartilsabstände geringer als beim kleinbeerigen Klon. Der Median liegt mit 52% knapp unterhalb des Medians des kleinbeerigen Klons. Der Median des aufrechten Klons liegt beträgt 62%, Minimum und Maximum liegen bei 33% bzw. 90%. Der höchste Median ist mit 80% der des kompakten Klons. Beim kompakten Klon gibt es keinen Maximum Wert, jedoch einen Minimum Wert von 50%.

Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen den Klonen ($p < 0,05$). Als Post-hoc-Test wurde der Dunn-Bonferroni-Test durchgeführt. Dieser ergab eine sehr signifikant höhere Lebensfähigkeit der Pollen des kompakten Klons im Vergleich zum kleinbeerigen Klon sowie lockerbeerigen Klon ($p < 0,01$).

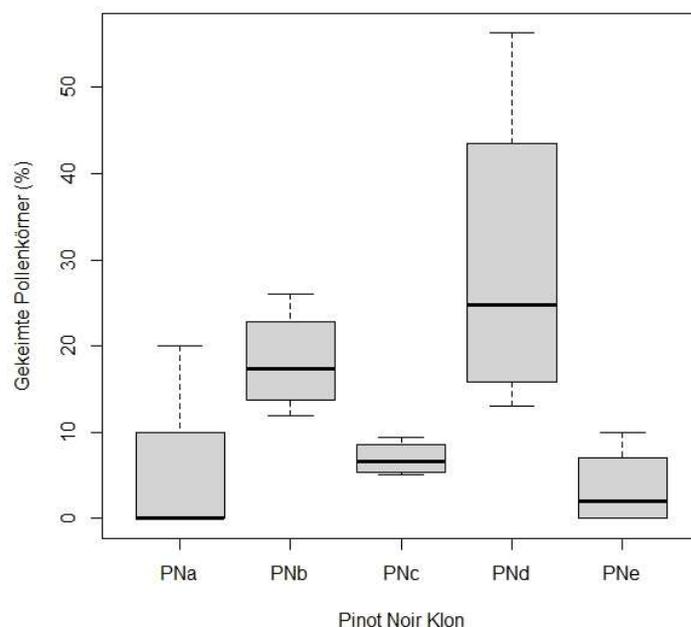


Abbildung 19: Gekeimte Pollenkörner in %. Werte von 4 Wiederholungen. Keimung in 15%iger Zuckerlösung. PNa=kleinbeeriger Klon, PNb=kompakter Klon, PNc=kleinbeeriger Klon, PNd=aufrechter Klon, PNe=lockerbeeriger Klon

In Abbildung 19 zeigt sich, dass die Mediane der Klone sehr unterschiedlich liegen. Die geringsten Mediane weisen die beiden kleinbeerigen und der lockerbeerige Klon auf (a, c und e). Der Median des kleinbeerigen Klons a liegt bei 0%, der Maximum Wert bei 20%. Beim kleinbeerigen Klon c ist die Box sowie die Whisker sehr kurz. Der Median beträgt in dem Fall 7%. Beim lockerbeerigen Klon e beträgt der Median 2%, der maximale Wert beträgt 10%. Der höchste Median mit 25% findet sich beim aufrechten Klon (PNd), hier zeigt sich außerdem die größte Box, mit einem sehr langen Whisker nach oben. Der Maximum Wert beträgt 56%. Der Median des kompakten Klons liegt bei 18%.

Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen den Keimungsraten der Klone ($p < 0,05$). Bezüglich der Pollenkeimungsrate sind signifikante Unterschiede zwischen den Spätburgunder Klonen vorzufinden. Die Pollenkeimungsrate des kompakten Klons ist signifikant höher als die des kleinbeerigen Klons a und des lockerbeerigen Klons ($p < 0,05$). Außerdem ist die Pollenkeimungsrate des aufrechten Klons signifikant höher als die des kleinbeerigen Klons a ($p < 0,05$) und sehr signifikant höher als die des lockerbeerigen Klons ($p < 0,01$). Der kleinbeerigen Klon c zeigt ebenfalls eine signifikant höhere Pollenkeimungsrate im Vergleich zum lockerbeerigen Klon ($p < 0,05$).

4.2.2 Vergleich der reproduktiven Parameter

Zeigt sich der kleinbeerige bzw. lockerbeerige Aufbau in den reproduktiven Parametern?

Tabelle 4: Unterschiede in den reproduktiven Parametern von drei verschiedenen Pinot Noir Klonen. PNa=kleinbeerig, PNb=kompakt, PNe=lockerbeerig. Werte sind Mittelwerte aus zwei Trauben pro Klon \pm Standardabweichung. Anzahl der Samen pro Beere ist der Durchschnitt aus zehn Beeren.

Parameter	Klon		
	PNa	PNb	PNe
Gesamtzahl Beeren	170 \pm 45,3	153 \pm 2,8	111,5 \pm 21,9
Lebende Fruchtknoten	0	0	0
Samenlose Beeren	40 \pm 52,3	0,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,7
Samenhaltige Beeren	130 \pm 97,6	152,5 \pm 3,5	110 \pm 21,2
Gesamtzahl Samen	132 \pm 104,7	296 \pm 28,3	181 \pm 26,9
Samen pro Beere	1,3 \pm 0,7	1,5 \pm 0,3	1,8 \pm 0,3
Schwimmer	33,5 \pm 27,6	10 \pm 7,1	15 \pm 9,9
Nichtschwimmer	84,5 \pm 57,3	286 \pm 21,2	166 \pm 36,8
Millerandage Index	2,86 \pm 3,8	0,03 \pm 0	0,1 \pm 0
Fruchtbarkeitsrate Traube	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0	0,4 \pm 0

In Tabelle 4 zeigt sich, dass sich die reproduktiven Parameter der drei Spätburgunderklone unterscheiden. Die geringste Gesamtzahl an Beeren hat der lockerbeerige Klon e, die größte Gesamtzahl an Beeren findet sich beim kleinbeerigen Klon a. Bei diesem Klon finden sich im Gegensatz zu den beiden anderen wesentlich mehr samenlose Beeren, 40 der 170 Beeren sind samenlos. Dementsprechend ist die Gesamtzahl Samen sowie die Samenzahl pro Beere geringer als beim lockerbeerigen und kompakten Klon. Auch im hohen Millerandage Index und in der geringsten Fruchtbarkeitsrate pro Traube zeigen sich die hohe Anzahl an samenlose Beeren und die geringe Anzahl an Samen. Der kompakte Klon hat die höchste Anzahl an Gesamtbeeren, samenlose Beeren sind hier kaum zu finden, dementsprechend gering ist der Millerandage Index mit 0,03 und hoch die Fruchtbarkeitsrate pro Traube (0,5). Da nur zwei Wiederholungen pro Klon vorhanden sind, können an dieser Stelle keine statistisch abgesicherten Aussagen getroffen werden.

4.2.3 Tetrazolium Test

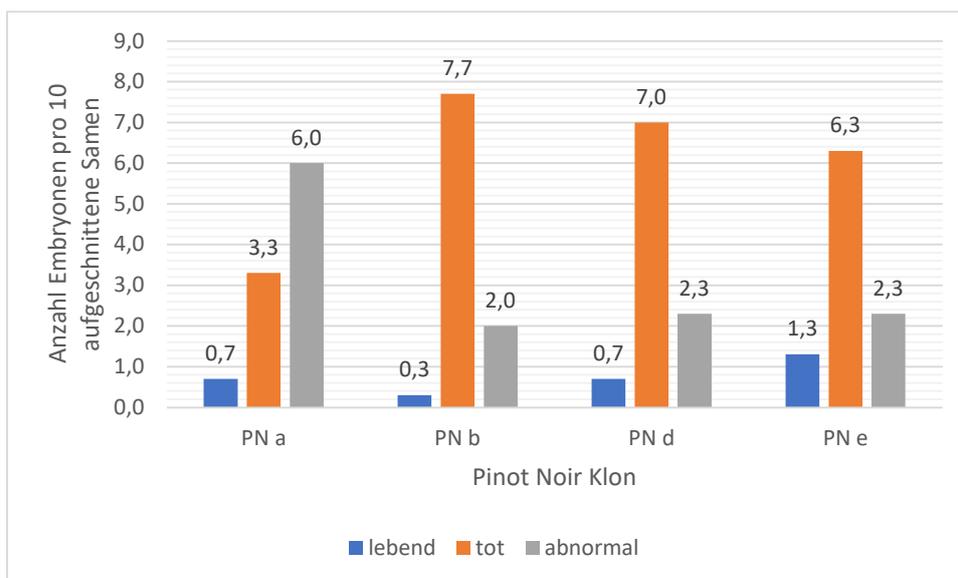


Abbildung 20: Anzahl Embryonen pro zehn aufgeschnittene Samen, bzw. pro maximale Anzahl. Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen. PNa=kleinbeerig, PNb=kompakt, PNd=aufrecht, PNe=lockerbeerig

In Abbildung 20 kann man erkennen, dass bei drei von vier Pinot Noir Klonen der Großteil der Embryonen tot ist. So sind beim kompakten Klon im Schnitt 7,7 von 10 Embryonen tot. Beim aufrechten Klon sind es 7, beim lockerbeerigen Klon sind es 6,3 Embryonen. Nur beim kleinbeerigen Klon überwiegt die Anzahl der abnormalen Embryonen die der toten

Embryonen. Hier sind 6 von 10 Embryonen abnormal. Bei den anderen Klonen sind es 2 (PNb) bis 2,3 (PNd und PNe) abnormale Embryonen. Die Anzahl der lebenden Embryonen ist bei allen Klonen sehr gering. Außer beim lockerbeerigen Klon sind es im Schnitt weniger als ein Embryo, der pro zehn aufgeschnittene Samen lebte.

Der Kruskal-Wallis-Test konnte keinen Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen den verschiedenen Pinot Noir Klonen feststellen.

4.3 Topfrebenversuch

4.3.1 Phänologische Entwicklung

Sorte Mitschurinski: Varianten 1 und 3

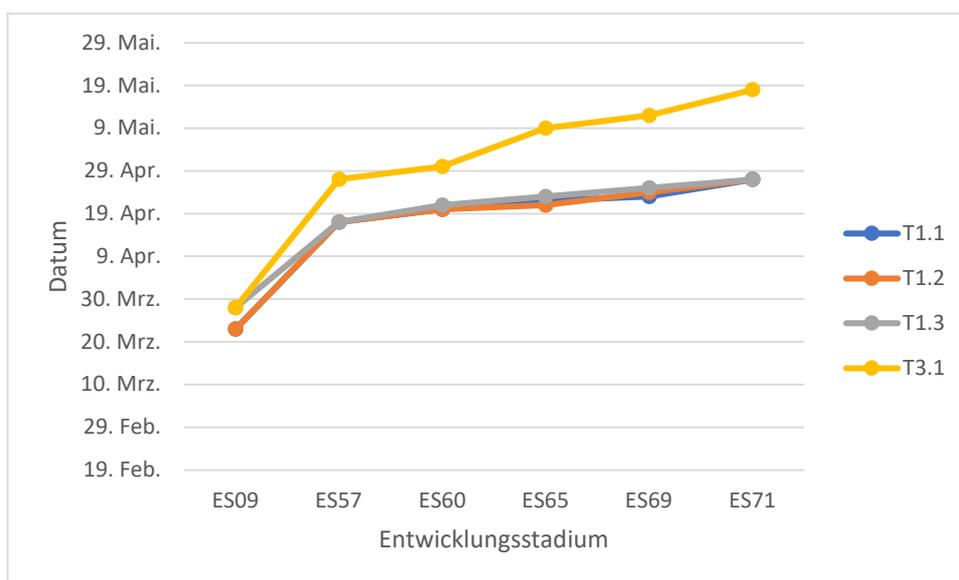


Abbildung 21: Phänologische Entwicklung der Mitschurinski Topfreben mit Fokus auf der Blüte der warmen Variante (1) und der Freiland Variante (3). Bonitur des Entwicklungsstadiums mittels BBCH-Code. ES09=Knospenaufbruch, ES57=Einzelblüten abgespreizt, ES60=erste Blütenköpchen lösen sich, ES65=Vollblüte, ES69=Ende Blüte, ES71=Fruchtansatz

In Abbildung 21 ist die phänologische Entwicklung der Mitschurinski Topfreben aufgetragen. Es beginnt mit dem Knospenaufbruch und zeigt dann ab dem Abspreizen der Einzelblüten (ES57) den Verlauf der Blüte. Der Austrieb beginnt mit dem Knospenaufbruch, hier liegen fünf Tage Unterschied zwischen dem Austrieb von T1.1 und T1.2 am 23.03.2020 und dem Austrieb von T1.3 und T3.1 am 28.03.2020. Ab dem ES57 verläuft die phänologische Entwicklung der Mitschurinski Reben der Variante 1 fast synchron, die Unterschiede sind minimal. Die Entwicklung der Topfrebe 3.1 liegt nach dem Austrieb

hinter der der Variante 1. Außerdem steigt die Entwicklungslinie stärker an, vor allem zwischen dem ersten Käppchenabwurf (ES60) und der Vollblüte (ES65). Es zeigt sich, dass die Blüteperiode der Mitschurinski Rebe 3.1 wesentlich länger ist. Den Fruchtansatz erreichen die Topfreben der Variante 1 am 27.04.2020, während sich die Topfrebe 3.1 im Stadium des Fruchtansatzes am 18.05.2020 befindet.

Sorte Phönix: Varianten 2 und 4

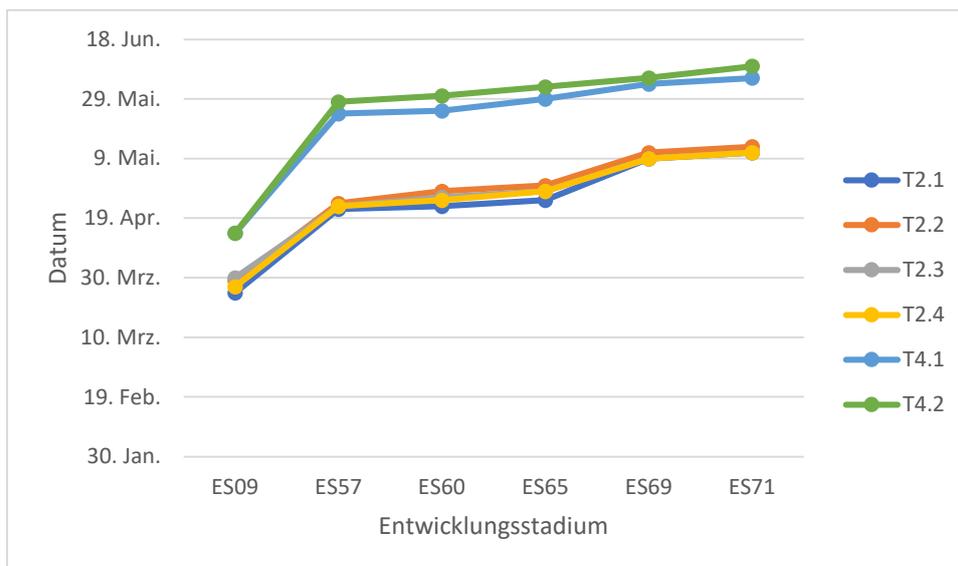


Abbildung 22: Phänologische Entwicklung der Phönix Topfreben mit Fokus auf der Blüte der moderaten Variante (2) und der Freiland Variante (4). Bonitur des Entwicklungsstadiums mittels BBCH-Code. ES09=Knospenaufbruch, ES57=Einzelblüten abgespreizt, ES60=erste Blütenkäppchen lösen sich, ES65=Vollblüte, ES69=Ende Blüte, ES71=Fruchtansatz

In Abbildung 22 sieht man die phänologische Entwicklung der Phönix Töpfe der moderaten Variante (2) sowie der Freiland Variante (4). Die Entwicklung der moderaten Variante verläuft sehr synchron vom Knospenaufbruch bis zum Fruchtansatz, es gibt keine großen Unterschiede zwischen den Topfreben. Lediglich der Verlauf von den ersten sich ablösenden Käppchen bis zur Vollblüte variiert etwas zwischen den Reben der Variante 2. Die ersten Blütenkäppchen lösen sich zwischen dem 23.04.2020 (T2.1) und dem 28.04.2020 (T2.2). Dementsprechend erreicht T2.1 als erstes die Vollblüte am 25.04.2020 und als letztes T2.2 am 30.04.2020. Auch die phänologische Entwicklung der beiden Freiland Topfreben verläuft sehr ähnlich, beide treiben am 14.04.2020 aus, im weiteren Verlauf entwickelt sich T4.1 etwas schneller als T4.2. So lösen sich bei T4.1 am 25.05.2020 die ersten

Blütenköppchen, bei T4.2 am 30.05.2020. Zwischen der Vollblüte der moderaten Variante und der Vollblüte der Freilandvarianten liegt ungefähr ein Monat.

4.3.2 Witterungsverlauf im Freiland und Temperaturverlauf im Gewächshaus

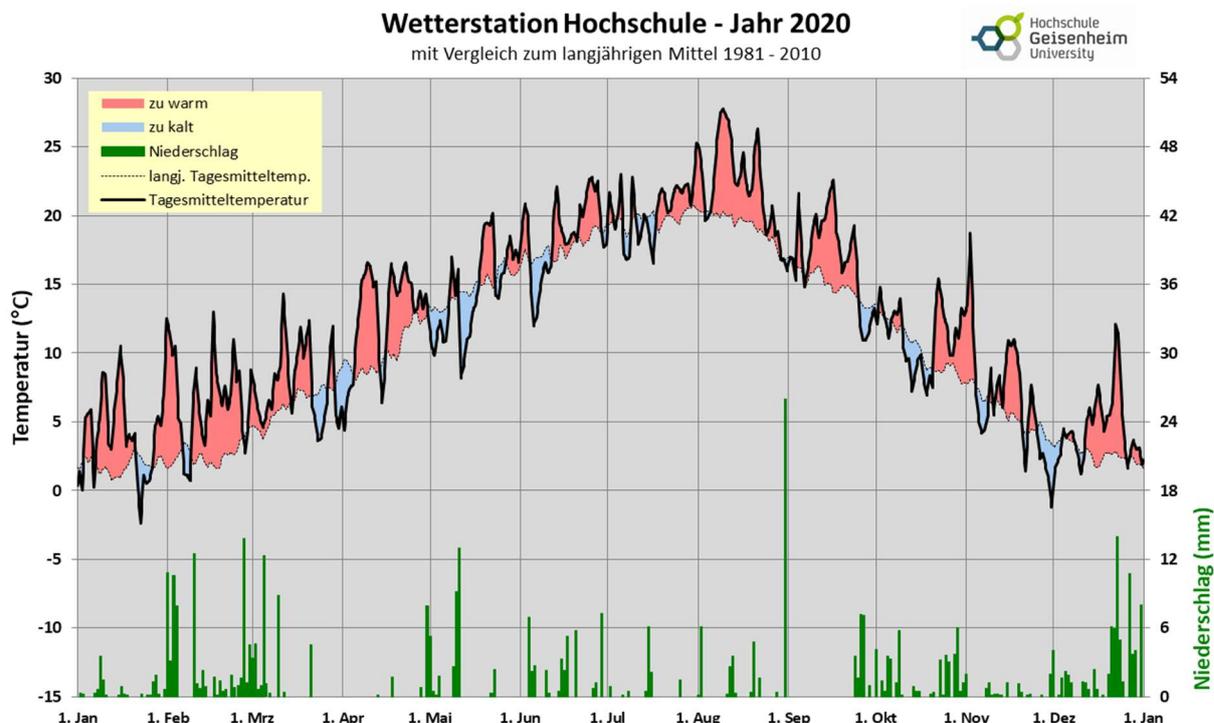


Abbildung 23: Witterungsverlauf im Jahr 2020 in Gm. Wetterstation der Hochschule. Quelle: (Baus und Ehlig 2021)

In Abbildung 23 ist der Witterungsverlauf des Jahres 2020 am Standort der Hochschule aufgetragen. Auffallend ist, dass zum Blühbeginn Ende Mai eine kalte Periode am Anfang des Monats Juni folgte. Die zwei Freiland Topfreben der Sorte Phönix (T4.1 und T4.2) befanden sich Anfang Juni in der abgehenden Blüte (vgl. Abb. 22). Auch Anfang Mai gab es eine Periode, die deutlich kälter als das Mittel lag, hier fielen die Temperaturen teilweise unter 10°C (vgl. Abb. 23). Die Blüte der Topfrebe 3.1 fiel in diese Periode. Am 30.04.2020 lösten sich die ersten Blütenköppchen ab, die Vollblüte wurde am 09.05.2020 erreicht. Dazwischen lagen die Tagesmittel-Temperaturen an der Hochschule teilweise um die 10°C: 9,8°C am 02.05.2020 und 10,8°C am 05.05.2020. Tagesminimumwerte lagen sogar teilweise unter 3°C, wie z.B. am 03.05., 06.05. und 07.05.2020 (Baus und Ehlig 2021). Bei den Freiland Töpfen der Sorte Phönix (T4.1 und T4.2) lagen die Temperaturen in etwa zwischen 17°C und 20°C, jedoch regnete es bei T4.2 in die abgehende Blüte (Baus und Ehlig 2021).

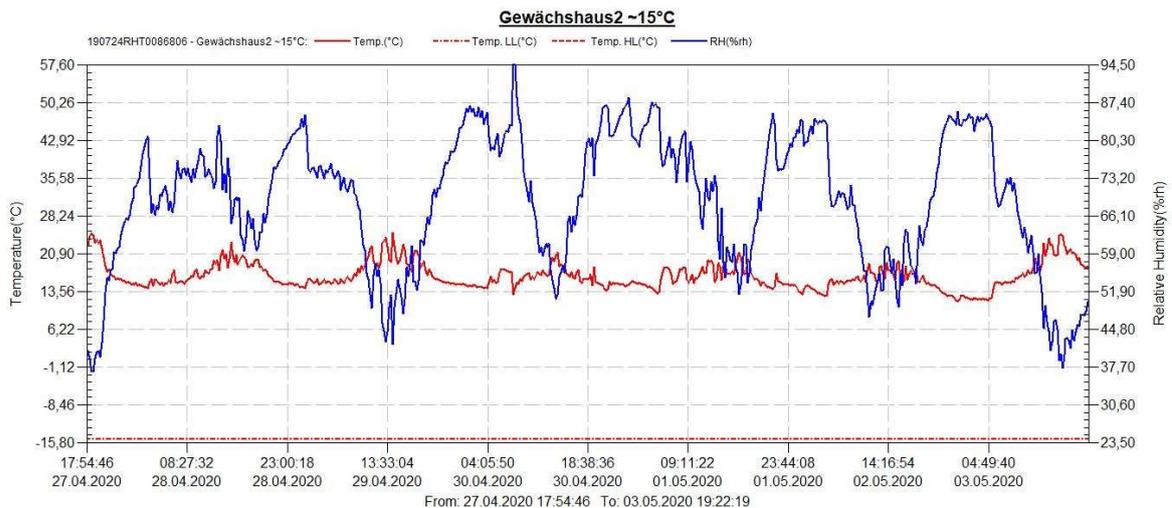


Abbildung 24: Temperaturverlauf im moderaten Gewächshaus. Aufzeichnung mittels PeakTech Datenlogger Modell 5185. Blüteperiode der Phönix Topfreben T2.1 bis T2.4.

In Abbildung 24 sieht man den Temperaturverlauf sowie die Relative Feuchtigkeit im Gewächshaus mit den moderaten Temperaturen. Die Temperaturen während der Blüte der Phönix Töpfe 2.1 bis 2.4 bewegten sich zwischen 14°C und knapp 20°C. Nur an einem Tag, am 29.04.2020 stiegen die Temperaturen mittags auf bis zu 25°C an. Nachts kühlte es sich dann wieder auf knapp 13°C ab. Die Relative Feuchtigkeit unterlag großen Schwankungen. Nachts lag die Relative Feuchtigkeit oft zwischen 80,3% und 87,4%. Mittags am 29.04.2020 lagen die Werte in etwa zwischen 44,4% und 51,5% (vgl. Abb. 24).

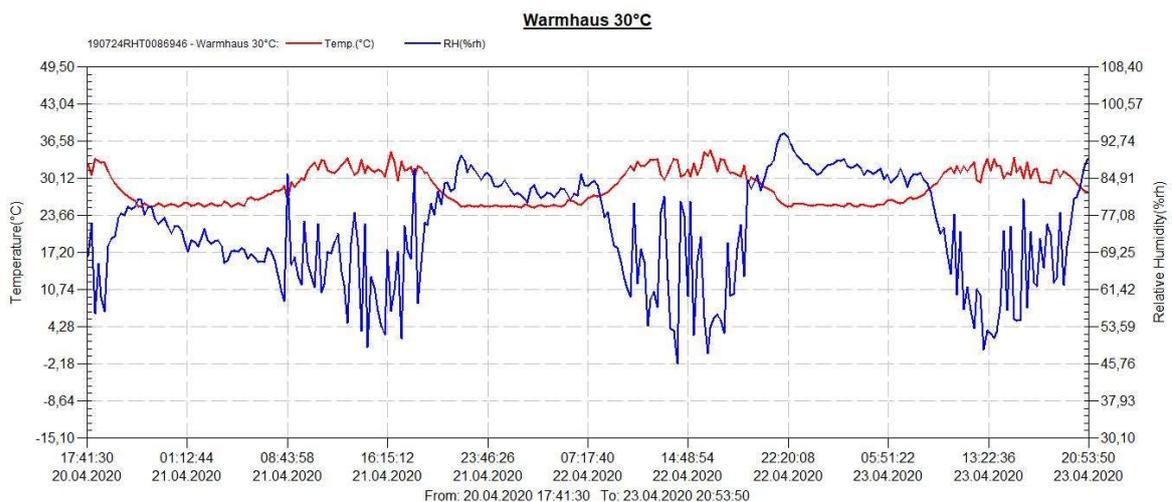


Abbildung 25: Temperaturverlauf im warmen Gewächshaus. Aufzeichnung mittels PeakTech Datenlogger Modell 5185. Blüteperiode der Mitschurinski Topfreben T1.1 bis T1.3

In Abbildung 25 ist die Temperatur sowie die Relative Feuchtigkeit im warmen Gewächshaus aufgetragen. Betrachtet wird hier die Temperatur während der Blüte der Topfreben der Variante 1. Tagsüber betrug die Temperatur immer in etwa 32°C, nachts kühlte es sich im Gewächshaus auf 25-26°C ab. Die Relative Feuchtigkeit erreichte nachts Maximumwerte zwischen 93% und 85%. Die Relative Feuchtigkeit schwankte jedoch teilweise stark, wie z.B. tagsüber am 22.04.2020 zwischen etwa 80% und 45,8% (vgl. Abb. 25).

4.3.3 Pollenlebensfähigkeit

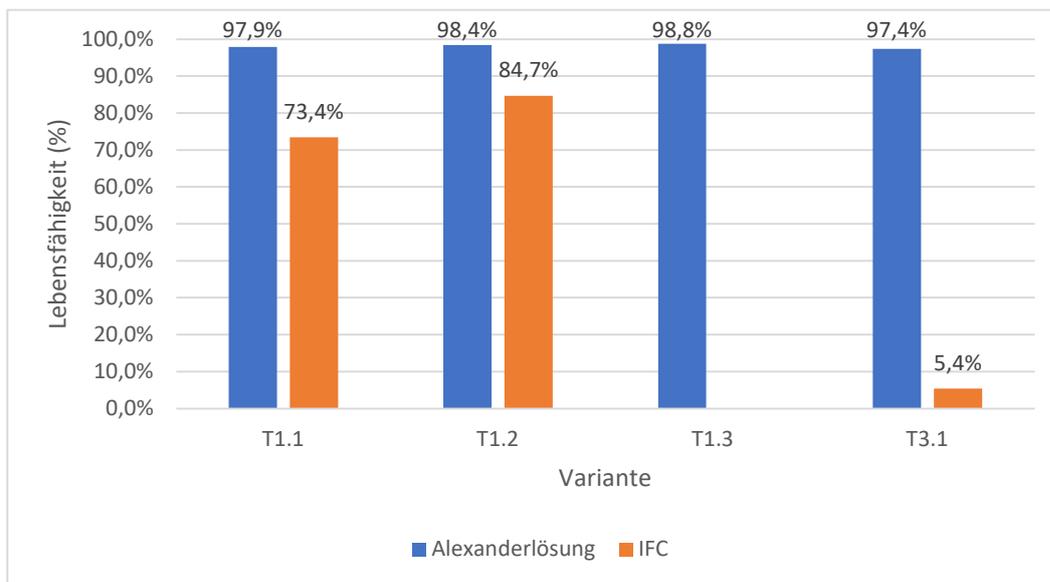


Abbildung 26: Lebensfähigkeit der Pollen der Sorte Mitschurinski in %. Untersucht durch Zählkammer und Alexanderlösung in Gm und die IFC in den Niederlanden. Zählkammer: Relative Häufigkeit ermittelt aus den Mittelwerten von lebenden und nicht lebenden Pollen der beiden Kammern sowie aus zwei Zählungen. Variante 1 = warme Variante, Variante 3 = Freiland. T1.3 kein IFC-Wert, da nicht genügend Pollen vorhanden war.

Die Lebensfähigkeit in % der Pollen der Mitschurinski Töpfe liegt bei der Alexanderlösung sehr nah beieinander und ist mit 97,4% bis 98,8% sehr hoch. Im Gegensatz dazu hat die IFC eine geringere Lebensfähigkeitsrate der Pollen der Reben 1.1 und 1.2 ermittelt, die insgesamt jedoch noch als hoch bezeichnet werden kann. Die Werte beim Mitschurinski Topf 3.1 unterscheiden sich drastisch. Während die Alexanderlösung eine sehr hohe Lebensfähigkeit von 97,4% ermittelte, ergab die IFC nur eine sehr geringe Lebensfähigkeit von 5,4% (vgl. Abb. 26). Für T1.3 konnte leider kein vergleichender IFC Wert ermittelt werden, da nicht genug Pollen vorhanden war, um eine Probe in die Niederlande zu schicken.

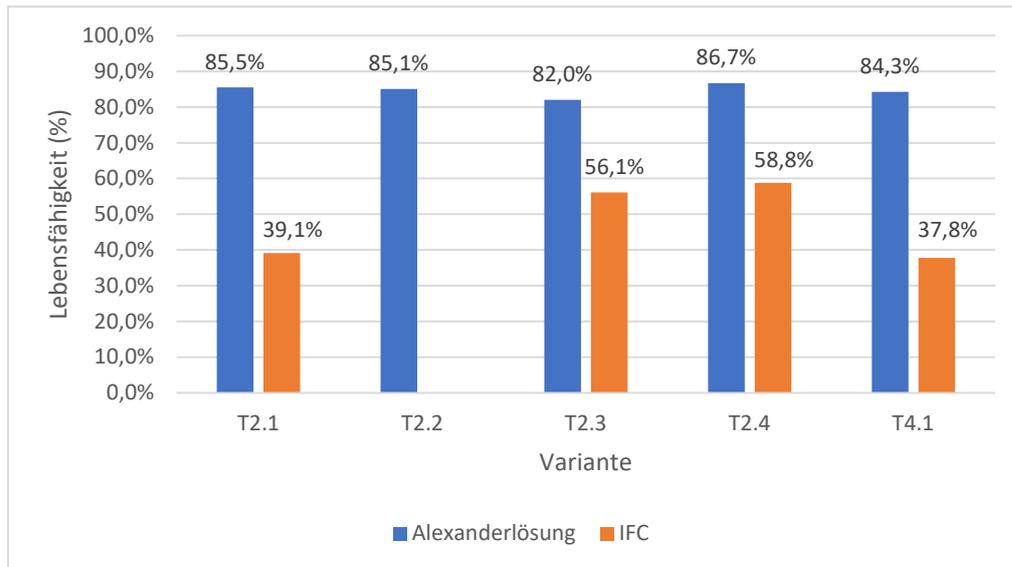


Abbildung 27: Lebensfähigkeit der Pollen der Sorte Phönix in %. Untersucht durch Zählkammer und Alexanderlösung in Gm und die IFC in den Niederlanden. Zählkammer: Relative Häufigkeit ermittelt aus den Mittelwerten von lebenden und nicht lebenden Pollen der beiden Kammern sowie aus zwei Zählungen. Variante 2 = moderate Variante, Variante 4 = Freiland. T2.2 kein IFC Wert, da nicht genügend Pollen vorhanden war

Die Lebensfähigkeit in % der Pollen der Phönix Töpfe ist bei der Alexanderlösung hoch und liegt eng beieinander. Sie bewegt sich zwischen 82,0 % für T2.3 und 86,7 % für T2.4. Die IFC ermittelte für alle Topfreben geringere Werte. Für die Lebensfähigkeit der Pollen von T2.3 und T2.4 ergab die IFC eine ähnliche Lebensfähigkeit von 56,1% und 58,8%. Auch für die Pollen der Topfreben 2.1 und 4.1 ergaben sich ähnliche Lebensfähigkeitsraten von 39,1% und 37,8% (vgl. Abb. 27). Für T2.2 konnte leider kein vergleichender IFC Wert ermittelt werden, da nicht genug Pollen vorhanden war, um eine Probe in die Niederlande zu schicken.

Da bei der Zählkammer mit zwei Zählungen, also zwei Wiederholungen gearbeitet wurde, ist eine statistische Aussage nicht möglich.

4.3.4 Pollenkeimungsrate

Sorte: Mitschurinski: Varianten 1 und 3

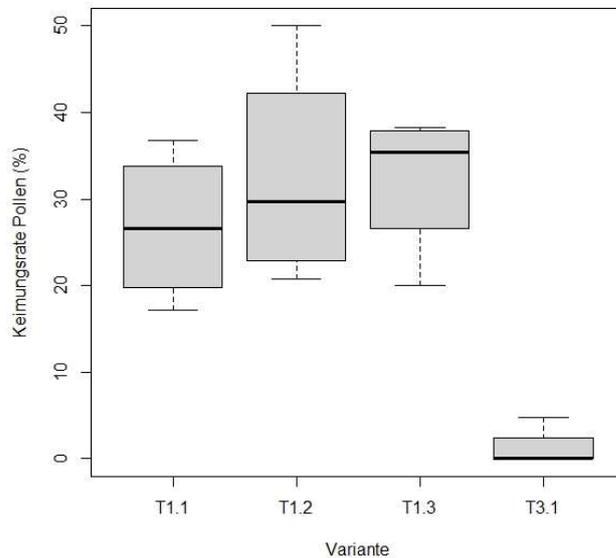


Abbildung 28: Keimungsrate Pollen in %. Werte aus vier Wiederholungen. Variante 1 = warm, Variante 3 = Freiland

In Abbildung 28 zeigt sich, dass die Pollen der Topfrebe 3.1 die geringste Keimungsrate aufweisen, der Median beträgt 0%. Auch der Maximumwert ist mit 4,8% sehr gering. Die Keimungsraten der Pollen von T1.1 und T1.2 liegen mit einem Median von 26,6% und 29,8% nah aneinander. Die Topfrebe 1.3 zeigt die höchste Keimungsrate der Pollen, der Median beträgt in dem Fall 35,4%. Der Minimumwert liegt mit 20% auf Höhe des Minimums von T1.2. Die maximale Pollenkeimungsrate von T1.2 liegt mit 50% über den Maximalkeimungsraten der anderen Töpfe. Insgesamt liegt bei 1.2 mit der großen Box die größte Datenstreuung vor.

Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab einen Unterschied bezüglich der zentralen Tendenz ($p < 0,05$).

Die Pollenkeimungsraten der Varianten 1.1 und 1.2 sind signifikant höher als die Keimungsraten der Pollen der Topfrebe 3.1 ($p < 0,05$). Die Keimungsrate der Pollen der Variante 1.3 ist sehr signifikant höher als der Pollen der Topfrebe 3.1 ($p < 0,01$). Damit

unterscheiden sich die Keimungsraten der Pollen aller Topfreben der Variante 1 signifikant von der Pollenkeimungsrate der Variante 3.

Sorte Phönix: Varianten 2 und 4

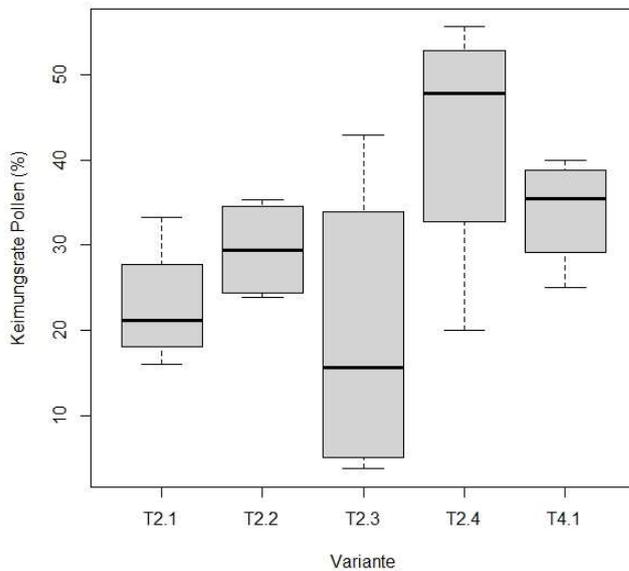


Abbildung 29: Keimungsrate Pollen in %. Werte aus vier Wiederholungen. Variante 2 = moderat, Variante 4 = Freiland

In Abbildung 29 sind die Pollenkeimungsraten der Phönix Töpfe aufgetragen. Die geringste Keimungsrate der Pollen weist T2.3 mit einem Median von 15,7% auf. Auffällig ist außerdem die lange Box, vor allem der Abstand zwischen Median und oberem Quartil sowie dem Maximalwert ist sehr lang. Die Werte reichen von 3,7% als Minimum bis zu 42,9% als Maximum. Die höchste Pollenkeimungsrate zeigen die Pollen der Topfrebe 2.4 mit einem Median von 47,8%. Hier ist der Abstand zwischen Median und unterem Quartil sowie dem Minimumwert sehr groß, dieser liegt bei einer Keimungsrate von 20%. Die Keimungsrate der Pollen von T4.1 ist höher als die von T2.1 und T2.2. Der Median beträgt für T4.1 35,4%, bei T2.1 sind es 21,2% und bei T2.2 29,4%. Insgesamt ist die Datenstreuung bei diesen drei Topfreben am geringsten, da die Box-Whisker-Plots hier kleiner sind als bei T2.3 und T2.4.

Zwischen den Pollenkeimungsraten der Varianten besteht kein signifikanter Unterschied.

4.3.5 Reproduktive Parameter

Sorte Mitschurinski: Varianten 1 und 3

Tabelle 5: Untersuchte reproduktive Parameter der Sorte Mitschurinski. Variante 1 = warm, Variante 3 = Freiland, Michu_JKI = Kontrolle Mitschurinski vom JKI. Werte stellen den Mittelwert aus drei Trauben (Wiederholungen) \pm Standardabweichung dar.

Parameter	Variante				
	T1.1	T1.2	T1.3	T3.1	Michu_JKI
Gesamtzahl Beeren	24 \pm 3,6	40,7 \pm 12,7	39,3 \pm 18,5	77 \pm 17,5	25,7 \pm 4,9
Lebende Fruchtknoten	0,7 \pm 1,2	0	0	0	3,7 \pm 6,4
Samenlose Beeren	0	0,7 \pm 1,2	0	3,3 \pm 3,5	0
Samenhaltige Beeren	24 \pm 3,6	40 \pm 11,8	39,3 \pm 18,5	73,7 \pm 14,6	25,7 \pm 4,9
Millerandage Index	0,3 \pm 0,5	0,1 \pm 0,2	0	0,4 \pm 0,4	0,9 \pm 1,6
Gesamtzahl Samen	59,7 \pm 14	103 \pm 27,8	83 \pm 38,7	93,3 \pm 29	44 \pm 10,6
Samen pro Beere	2,5 \pm 0,2	2,9 \pm 0,3 a	2,3 \pm 0,4	1,8 \pm 0,2	1,8 \pm 0,3
Schwimmer	16 \pm 6,6	27,7 \pm 6,4	25,3 \pm 11	19,7 \pm 2,9	11 \pm 6,1
Nichtschwimmer	43,7 \pm 9,6	75,3 \pm 27,6	57,7 \pm 28	73,7 \pm 27	33,7 \pm 10
Fruchtbarkeitsrate	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0
Gesamtzahl Blüten	174,7 \pm 60,5	220,3 \pm 23,7	161 \pm 38,6	167,3 \pm 51	n.t
Coulure Index	8,5 \pm 0,5	8,2 \pm 0,4	7,6 \pm 1,1	5,3 \pm 0,3	n.t
Fruchtansatz	14,6 \pm 3,7	18,2 \pm 4,2	24,3 \pm 10,8	46,7 \pm 3,3	n.t

Der Kruskal-Wallis-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der zentralen Tendenz zwischen den Varianten für folgende Parameter: Samenlose Beeren, Millerandage Index, Lebende grüne Fruchtknoten, Anzahl Schwimmer, Anzahl Nichtschwimmer, Gesamtzahl Samen pro Traube, Gesamtzahl Blüten und dem Coulure Index. Einen signifikanten Unterschied der zentralen Tendenz ($p < 0,05$) gibt es bei Folgenden Parametern: Gesamtzahl Beeren, Samenhaltige Beeren, Samen pro Beere, Fruchtansatz und die Fruchtbarkeitsrate.

Tabelle 6: Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 3. Signifikanzniveau mit einem Stern bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Signifikanzniveau mit zwei Sternen bedeutet einen sehr signifikanten Unterschied ($p < 0,01$).

Parameter	Varianten	Signifikanzniveau
Gesamtbeeren	Michu_JKI + T3.1	*
	T1.1 + T3.1	**
Samenhaltige Beeren	Michu_JKI + T3.1	*
	T1.1 + T3.1	**
Samen pro Beere	Michu_JKI + T1.2	**
	T1.2 + T3.1	**
Fruchtbarkeitsrate	Michu_JKI + T1.2	*
	T1.1 + T3.1	**
	T1.2 + T3.1	**
Fruchtansatz	T1.1 + T3.1	**
	T1.2 + T3.1	*

Die Freiland Topfrebe 3.1 hat eine sehr signifikant höhere Anzahl an Gesamtbeeren als die Topfrebe 1.1 ($p < 0,01$) und signifikant mehr Gesamtbeeren als die Kontrolle des JKI ($p < 0,05$). Dasselbe gilt für die Anzahl der samenhaltigen Beeren. Mit fast drei Samen pro Beere (vgl. Tab. 5) hat die Topfrebe 1.2 signifikant mehr Samen pro Beere als die Kontrolle des JKI und T3.1 ($p < 0,01$). Dies zeigt sich auch in der Fruchtbarkeitsrate der Trauben, die bei T1.1 und auch T1.2 signifikant höher ist als bei T3.1 ($p < 0,01$), außerdem ist die Fruchtbarkeitsrate von T1.2 ebenfalls signifikant höher als die der JKI Kontrolle ($p < 0,05$). Bezüglich des Fruchtansatzes lässt sich festhalten, dass der Fruchtansatz der Freiland Topfrebe mit 46,7% am höchsten ist (vgl. Tab. 5). Damit ist der Fruchtansatz von T3.1 signifikant höher als der von T1.1 ($p < 0,01$) und als der von T1.2 ($p < 0,05$).

Sorte Phönix: Varianten 2 und 4

Tabelle 7: Untersuchte reproduktive Parameter der Sorte Phönix. Variante 2 = moderat, Variante 4 = Freiland. Werte stellen den Mittelwert aus drei Trauben (Wiederholungen) \pm Standardabweichung dar.

Parameter	Variante					
	T2.1	T2.2	T2.3	T2.4	T4.1	T4.2
Gesamtzahl Beeren	117,3 \pm 9,7	87,3 \pm 49,5	84,3 \pm 14,3	128,7 \pm 18	62,7 \pm 19,1	37 \pm 5,3
Lebende Fruchtknoten	19 \pm 5,2	0,3 \pm 0,6	3 \pm 2	3 \pm 5,2	0,3 \pm 0,6	0
Samenlose Beeren	39,3 \pm 8,5	2 \pm 1	15,7 \pm 11,7	27 \pm 14,1	20,7 \pm 5,7	16,3 \pm 2,9
Samenhaltige Beeren	78 \pm 11	85,3 \pm 48,6	68,7 \pm 3,2	101,7 \pm 23	42 \pm 17,4	20,7 \pm 4
Millerandage Index	4,3 \pm 0,5	0,3 \pm 0,1	2 \pm 1,1	2,3 \pm 1,3	3,3 \pm 0,7	4,4 \pm 0,6
Gesamtzahl Samen	122 \pm 23,6	157 \pm 88	113 \pm 18,4	171,7 \pm 65,3	70,3 \pm 27,8	27,3 \pm 6,7
Samen pro Beere	1,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	1,8 \pm 0,3	1,2 \pm 0,4
Schwimmer	34,7 \pm 25,9	72 \pm 53	95,7 \pm 36,4	96 \pm 41,6	15,7 \pm 9,3	8,3 \pm 6,8
Nichtschwimmer	87,3 \pm 5,9	85 \pm 41	17,3 \pm 18,2	75,7 \pm 41,3	54,7 \pm 19,2	19 \pm 3,5
Fruchtbarkeitsrate	0,3 \pm 0,04	0,5 \pm 0,02	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,03	0,2 \pm 0,1
						123 \pm
Gesamtzahl Blüten	147,3 \pm 14,1	95 \pm 66,4	116,7 \pm 80,5	186,7 \pm 88,7	n.t.	56,5
Coulure Index	0,7 \pm 1,1	0,2 \pm 2,4	0,8 \pm 3,8	2,2 \pm 2,6	n.t.	6,7 \pm 0,9
Fruchtansatz	80 \pm 8,4	97,4 \pm 24,1	89 \pm 36,7	76,7 \pm 27,1	n.t.	32,7 \pm 8,5

Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen Unterschied in der zentralen Tendenz für folgende Parameter ($p < 0,05$): Gesamtzahl Beeren, Samenlose Beeren, Samenhaltige Beeren, Millerandage Index, Lebende Fruchtknoten, Samenlose Beeren, Samenhaltige Beeren, Gesamtzahl Samen, Samen pro Beeren und Nichtschwimmer. Für die Parameter Fruchtbarkeitsrate, Schwimmer, Anzahl Blüten, Fruchtansatz und Coulure Index ergab sich kein Unterschied in der zentralen Tendenz.

Tabelle 8: Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten 2 und 4. Signifikanzniveau mit einem Stern bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Signifikanzniveau mit zwei Sternen bedeutet einen sehr signifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Signifikanzniveau mit drei Sternen bedeutet einen höchst signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

Parameter	Varianten	Signifikanzniveau
Gesamtbeeren	T2.1 + T4.2	*
	T2.4 + T4.1	*
	T2.4 + T4.2	**
Lebende Fruchtknoten	T2.1 + T2.2	*
	T2.1 + T2.4	*
	T2.1 + T4.1	*
	T2.1 + T4.2	**
Samenlose Beeren	T2.1 + T2.2	***
	T2.1 + T2.3	*
	T2.2 + T2.4	*
Samenhaltige Beeren	T2.1 + T4.2	*
	T2.2 + T4.2	*
	T2.4 + T4.1	*
	T2.4 + T4.2	**
Millerandage Index	T2.1 + T2.2	**
	T2.2 + T4.1	*
	T2.2 + T4.2	**
	T2.3 + T4.2	*
Gesamtzahl Samen	T2.1 + T4.2	*
	T2.2 + T4.2	*
	T2.4 + T4.1	*
	T2.4 + T4.2	**
Nichtschwimmer	T2.1 + T2.3	**
	T2.1 + T4.2	*
	T2.2 + T2.3	*
	T2.2 + T4.2	*
	T2.3 + T2.4	*

Bei den reproduktiven Parametern der Phönix Topfreben gibt es sehr viele signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten, aber auch innerhalb der Varianten. Die Übersicht über die signifikanten Unterschiede gibt Tabelle 8.

Die geringste Gesamtbeerenanzahl hat mit 37 Beeren die Trauben der Topfrebe 4.2, damit hat T4.2 signifikant weniger Beeren als T2.1 und T2.4 ($p < 0,05$ und $p < 0,01$). Auch die zweite Freiland Topfrebe 4.2 hat signifikant weniger Gesamtbeeren als die Topfrebe 2.4 ($p < 0,05$), welche mit 128,7 die höchste Gesamtbeerenanzahl besitzt. Lebende, grüne Fruchtknoten

sind nur bei T2.1 mit 19 Stück vermehrt aufgetreten. Bei der Anzahl der samenlosen Beeren gibt es ein höchst signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$): Bei der Topfrebe 2.2 gibt es nur zwei samenlose Beeren im Gegensatz zur Topfrebe 2.1, hier sind es 39,3. Der Millerandage Index der Topfrebe 2.1 und 4.2 ist sehr signifikant höher als der der Topfrebe 2.2 ($p < 0,01$). Bezüglich der Gesamtzahl der Samen lässt sich festhalten, dass vor allem T4.2 signifikant weniger Samen aufweist, da die Anzahl mit 27,3 sehr gering ist. Die Anzahl der Nichtschwimmer Kerne ist erneut vor allem bei T4.2 signifikant kleiner als bei T.2.1 und T2.2 ($p < 0,05$). Bei T2.3 findet sich mit 17,3 die geringste Anzahl an Nichtschwimmer Kernen, diese ist signifikant kleiner als bei T2.1, T2.2 und T2.4 ($p < 0,05$).

4.3.6 Tetrazolium Test

Sorte Mitschurinski: Variante 1 und 3

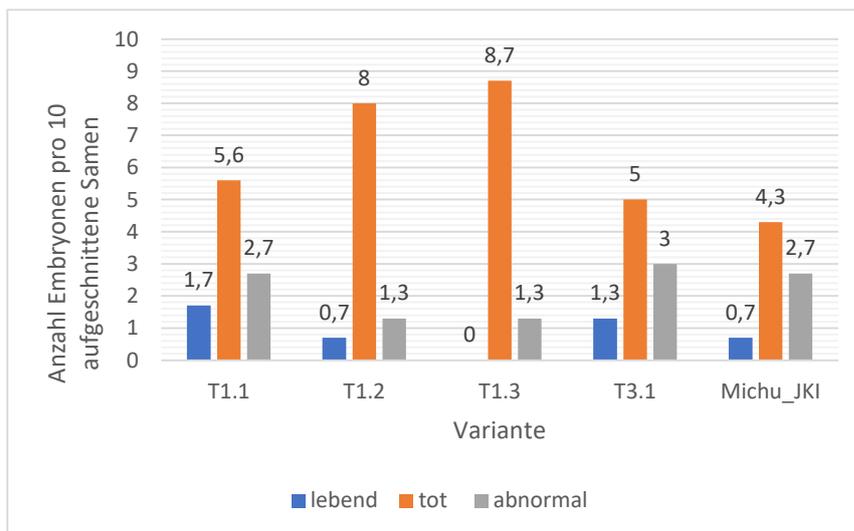


Abbildung 30: Anzahl Embryonen pro zehn aufgeschnittene Samen. Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen. Variante 1 = warm, Variante 3 = Freiland, Michu_JKI = Kontrolle vom JKI

In Abbildung 30 lässt sich erkennen, dass die Anzahl der lebenden und abnormalen Embryonen pro zehn Samen bei allen Varianten sehr gering ist. Bei T1.3 gibt es keinen lebenden Embryo, bei den anderen Varianten bewegen sich die Zahl der lebenden Embryonen zwischen 0,7 (T1.2 und Mitschurinski Kontrolle des JKI und 1,7 (T1.1)). Die höchste Anzahl an abnormalen Embryonen findet sich mit drei bei der Variante 3.1 und die geringste Anzahl mit 1,3 bei T1.2 und T1.3. Bei allen Varianten ist die Anzahl der toten Embryonen am höchsten. Die höchste Anzahl an toten Embryonen finden sich bei den

Samen der Topfrebe 1.3 (8,7) und der Topfrebe 1.2 (8). Danach folgt T1.1 mit 5,6 und T3.1 mit 5 toten Embryonen pro zehn Samen. Die geringste Anzahl an toten Embryonen findet sich mit 4,3 bei der Kontrolle des JKI (vgl. Abb. 30).

Der Kruskal-Wallis-Test ergab keine Unterschiede in der zentralen Tendenz zwischen den Varianten.

Sorte Phönix: Variante 2 und 4

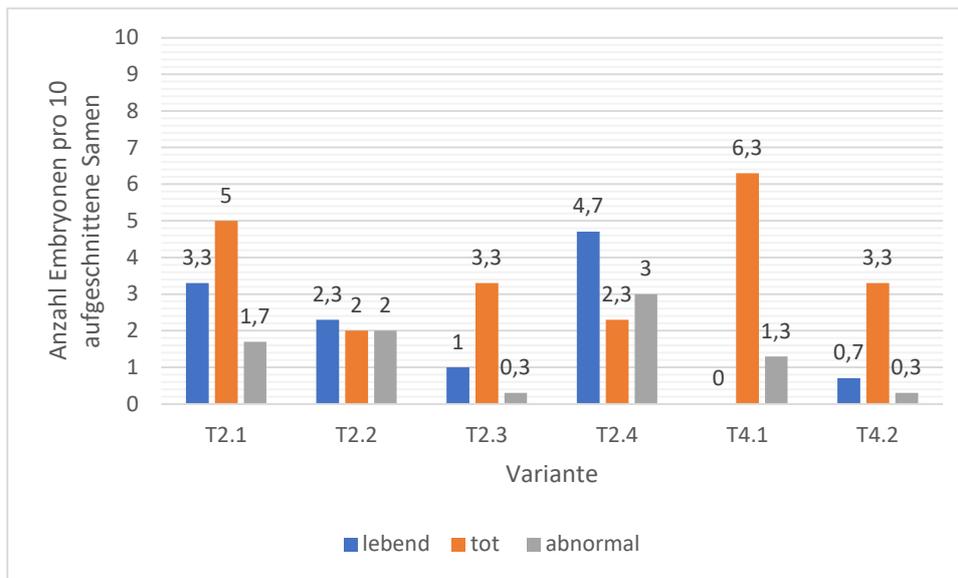


Abbildung 31: Anzahl Embryonen pro zehn aufgeschnittene Samen, bzw. pro maximale Anzahl. Werte sind der Mittelwert aus drei Wiederholungen. Variante 2 = moderat, Variante 4 = Freiland

In Abbildung 31 fällt auf, dass bei den Samen der Topfrebe 2.2 die Anzahl der lebenden, toten sowie abnormalen Embryonen fast identisch sind: 2,3 lebende, 2 tote und 2 abnormale Embryonen. Bei T2.1, T2.3, T4.1 und T4.2 überwiegt die Anzahl der toten Embryonen. Die größte Anzahl an toten Embryonen wurde dabei mit 6,3 bei der Variante 4.1 gefunden. Nur bei den Samen der Topfrebe 2.4 gab es mehr lebende Embryonen als tote oder abnormale. So sind es 4,7 lebende Embryonen, 3 abnormale und 2,3 tote Embryonen.

Der Kruskal-Wallis-Test konnte keinen Unterschied in der zentralen Tendenz zwischen den Varianten feststellen.

5 Diskussion

5.1 Sortenversuch

5.1.1 Pollenlebensfähigkeit

Vergleich der Methoden: Alexanderfärbung und IFC

In Abbildung 14 zeigt sich deutlich, dass die Alexanderfärbung eine höhere Lebensfähigkeitsrate in % ermittelt als die IFC. Nur in einem Fall sind die Ergebnisse beider Methoden nah aneinander, beim aufrechten Pinot Noir Klon d. Hier ist auch der einzige Fall, bei dem die IFC eine Lebensfähigkeit in % ergibt, die über der der Alexanderfärbung liegt. Die Alexanderfärbung steht im Verdacht, auch tote Pollenkörner anzufärben (Rodriguez-Riano und Dafni 2000). Dies würde die erhöhten Zahlen an lebenden Pollen erklären, die durch die Methode der Alexanderfärbung im Vergleich zur IFC ermittelt wurde. Doch nicht nur die Färbung alleine ist ein Indikator für die Lebensfähigkeit, sondern auch die Größe der Pollenkörner (Tello et al. 2018). So kann bestätigt werden, dass sich die nicht lebensfähigen Pollen klein und eingeschrumpft zeigten, im Gegensatz zu den lebenden Pollen (Heidmann et al. 2016) (vgl. Abb. 8).

Das manuelle Auszählen mit dem Auge nach der Färbung mit Alexanderlösung ist die einfachste Methode zur Ermittlung der Lebensfähigkeit der Pollen. Der Nachteil ist jedoch, dass der Zeitaufwand sehr hoch ist und die Genauigkeit der Daten sowie die Reproduzierbarkeit vermindert sein kann (Tello et al. 2018). Diese ist bei der IFC wesentlich höher, außerdem kann eine große Anzahl an Zellen in kurzer Zeit in einem standardisierten Ablauf analysiert werden (Heidmann et al. 2016). Eine weitere Methode wäre das Nutzen des sogenannten PollenCounters, der eine genaue Zählung der gesamten und lebenden Pollenkörner in einer geringen Zeit mit hoher Reproduzierbarkeit erlaubt. Der PollenCounter kann automatisiert mikroskopische Bilder von angefärbten Pollen auszählen (Tello et al. 2018). In Zukunft wäre ein Vergleich dieser drei Methoden sehr interessant, um herauszufinden, welche Methode sich am besten eignet. Außerdem ist es wichtig dabei zu analysieren, inwiefern die Ergebnisse der Methoden zur Lebensfähigkeit dabei mit den Keimungsraten der Pollen korrelieren. Die manuelle Alexanderfärbung zeigt generell eine hohe Korrelation mit den Keimungsraten der Pollen (Tello et al. 2018). Laut HEIDMANN UND DI BERARDINO (2017) ist jedoch genau das bei vielen Methoden problematisch, da die Zahlen der lebensfähigen Pollen nicht mit den Keimungsraten der Pollen korrelieren. Die

IFC verspricht in dieser Hinsicht sehr zuverlässige Ergebnisse (Heidmann und Di Berardino 2017).

5.1.2 Pollenkeimungsfähigkeit

Welche Zuckerkonzentration eignet sich am besten für die *in vitro* Keimung?

Es zeigt sich, dass die Pollen der Rebsorten unterschiedlich auf die verschiedenen Zuckerkonzentrationen reagieren. Es kann somit bestätigt werden, dass die Pollenkeimungsrate je nach Sorte und verwendeter Saccharosekonzentration variiert (Kelen und Demirtas 2003). Die Sorten Syrah und Cabernet Sauvignon erreichten die höchsten Pollenkeimungsraten bei 15% Saccharose, wobei die Pollen der Sorte Syrah in der 5%igen Saccharoselösung besser keimten als in der 10%igen. Bei Versuchen zur Pollenkeimung verschiedener Sorten von KELEN UND DEMIRTAS (2003) stieg die Keimungskapazität der Pollen mit ansteigender Zuckerkonzentration. Das gleiche Ergebnis zeigt sich bei der Sorte Cabernet Sauvignon. Die Steigerung der Zuckerkonzentration von 10% auf 15% geht bei dieser Sorte mit einer Steigerung der Pollenkeimung von 19,2% auf 57,5% einher. PADUREANU UND PATRAS (2018) erzielten die höchsten Pollenkeimungsraten und die längsten Pollenschläuche mit 15% und 25% Saccharose. Hypotonische Medien (0% und 5% Saccharose) sowie hypertonische Medien (50%, 70% und 100% Saccharose) stellten sich als ungeeignet für die Keimungsuntersuchungen der Pollen heraus (Padureanu und Patras 2018). Der Pollen des Grünen Veltliners scheint weniger anspruchsvoll zu sein als die von Cabernet Sauvignon und Syrah, da hier bei geringerer Zuckerkonzentration höhere Pollenkeimungsraten erreicht wurden. So zeigen die Pollen der Sorte Grüner Veltliner bei der 5%igen Zuckerlösung signifikant höhere Keimungsraten als die der andere zwei Sorten. Auch bei 10% Saccharose ist die Pollenkeimungsrate des Grünen Veltliner signifikant höher als die von Cabernet Sauvignon und Syrah. Bei 15% Saccharose gibt es keinen Unterschied zwischen den Sorten. 15% Saccharose scheint sich gut zu eignen für die *in vitro* Keimung, bei zwei von drei Sorten wurden hier die höchsten Keimungsraten erreicht. Außerdem scheinen bei dieser Zuckerkonzentration die Sortenunterschiede weniger ausgeprägt zu sein. Für eine Absicherung wäre eine Wiederholung der Versuche mit mehr Sorten notwendig.

Bessere Keimung der Pollen *in vitro*, wenn dem Keimungsmedium Borsäure zugesetzt ist?

Bor ist an der Bildung eines Zellwand-Polysaccharids beteiligt, welches für das Pollenschlauchwachstum benötigt wird. Damit spielt Bor eine wichtige Rolle für das

Pollenschlauchwachstum (Alva et al. 2015). Auch MAY (2004) konnte zeigen, dass bei einer Zugabe von 100 mg/L Borsäure zur Saccharoselösung, die Keimung *in vitro* gefördert wird. Für das Acepo Medium, welches Borsäure enthält, können diese Aussagen jedoch nicht bestätigt werden. So konnte keine Steigerung der Keimungsrate der Pollen erzielt werden und bei allen drei Rebsorten war die Keimungsrate sehr niedrig. Das Brewbaker Medium, welches ebenfalls Borsäure enthält, zeigt eine sehr unterschiedliche Verteilung für die Pollenkeimung der drei Sorten. Die Pollen von Syrah zeigten beim Brewbaker Medium die höchste Keimungsrate. Im Vergleich zur Pollenkeimungsrate von Cabernet Sauvignon ist die der Sorte Syrah signifikant höher für das Brewbaker Medium. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen der Versuche von BABY ET AL. (2016) mit demselben Medium, bei denen die Sorte Syrah ebenfalls mit 75% die höchste Keimungsrate zeigte. Auch die Keimung der Pollen der Sorte Grüner Veltliner konnte durch das Brewbaker Medium gesteigert werden, doch hier gibt es keinen signifikanten Unterschied zu den anderen zwei Sorten. Es zeigt sich, dass die Rebsorten sehr unterschiedlich auf die Zugabe der Borsäure reagieren und die Medienzusammensetzung je nach untersuchter Sorte gewechselt werden sollte. So scheint die Borsäure bei der Sorte Syrah in der Zusammensetzung des Brewbaker Mediums die Pollenkeimung zu stimulieren, bei Cabernet Sauvignon scheint es jedoch die Pollenkeimung zu vermindern (vgl. Abb. 16). Die Aussage von MAY (2004), dass Borsäure *in vitro* die Pollenkeimung stimuliert, kann also nicht allgemein für alle Rebsorten bestätigt werden.

Der direkte Vergleich zwischen den Medien zeigt eine sehr signifikant geringere Pollenkeimungsrate beim Acepo Medium im Gegensatz zum Brewbaker Medium sowie der Zuckerlösung. Damit wird bestätigt, dass das Acepo Medium sich nicht für diese Rebsorten geeignet hat, da die Pollenkeimungsrate signifikant kleiner ist. Zwischen dem Brewbaker Medium und der Zuckerlösung besteht kein signifikanter Unterschied, jedoch ist die große Schwankungsbreite der Daten beim Brewbaker Medium zu beachten, was darauf hindeutet, dass hier die Pollen der Rebsorten stark unterschiedlich auf das Medium reagieren (vgl. Abb. 17). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die 15%ige Saccharoselösung besser für einen Vergleich zwischen den Rebsorten eignet, wenn man das Medium nicht je nach Rebsorte wechseln möchte, da hier die Schwankungen geringer sind. Eine Wiederholung des Versuchs mit den gängigsten Rebsorten wäre sehr interessant, um zu schauen, wie die Pollen welcher Rebsorten auf den Zusatz von Borsäure reagieren. So könnte für jede Rebsorte das passende Pollenkeimungsmedium ermittelt werden.

5.2 Vergleich der Pinot Noir Klone

Unterscheiden sich die Pollen der Spätburgunder Klone bezüglich der Lebensfähigkeit und Keimungsfähigkeit? Hat dies Auswirkungen auf die reproduktiven Parameter?

Zwischen den Pollen der Pinot Noir Klone konnte ein Unterschied bezüglich der Keimungsfähigkeit und Lebensfähigkeit festgestellt werden. Die Lebensfähigkeit der Pollen des kompakten Klons unterscheidet sich signifikant von der des kleinbeerigen und des lockerbeerigen Spätburgunder Klons. Auch TELLO ET AL. (2018) stellten solche Unterschiede innerhalb verschiedener Klone der Sorte Tempranillo Tinto fest. Diese Klone unterschieden sich ebenfalls in ihren weinbaulichen Eigenschaften, die Klone mit einer geringeren Lebensfähigkeit der Pollen hatten weniger kompakte Trauben mit weniger Beeren pro Traube (Tello et al. 2018). Dies kann auch für die Spätburgunder Klone bestätigt werden. Der Millerandage Index des kleinbeerigen Klons lag weit über dem des kompakten und lockerbeerigen Klons, da der kleinbeerige Klon viele samenlose, kleine Beeren besitzt. Der lockerbeerige Klon hat wiederum die geringste Zahl an Beeren pro Traube. Die Pollen des lockerbeerigen Klons hatten im Gegensatz zum kompakten Klon eine geringere Lebensfähigkeit. Für eine statistische Absicherung sollte der Versuch das nächste Mal mit einer höheren Anzahl an Trauben pro Klon durchgeführt werden.

Auch in der Pollenkeimungsrate konnten Unterschiede für die verschiedenen Klone festgestellt werden. Die Pollenkeimungsrate des kleinbeerigen Klons a war signifikant geringer als die des kompakten und des aufrechten Klons. Außerdem zeigte sich für den lockerbeerigen Klon eine signifikant geringere Pollenkeimungsrate im Vergleich zum kleinbeerigen Klon c und zum kompakten Klon. Im Vergleich zum aufrechten Klon war die Pollenkeimungsrate des lockerbeerigen Klons sehr signifikant kleiner. Die Aussage von BABY ET AL. (2016), dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Pollenlebensfähigkeit und Keimungspotential gibt, kann bestätigt werden. Die Ergebnisse der Keimungsraten decken sich ebenfalls mit der oben beschriebenen Traubenstruktur der Spätburgunder Klone. Die geringere Beerenanzahl und damit die lockere Traubenstruktur resultieren beim lockerbeerigen Spätburgunder Klon also durch eine geringere Pollenlebensfähigkeit sowie einer geringeren Keimungsrate. TELLO ET AL. (2018) nennt diese beiden Faktoren ebenfalls im Zusammenhang mit einem geringeren Fruchtansatz. Die Traubenstruktur der verschiedenen Klone wird also durch die Pollenlebensfähigkeit und die Pollenkeimungsrate

bestimmt. Die lockerbeerige bzw. kleinbeerige Traubenstruktur bringt weinbauliche Vorteile mit sich, wie z.B. ein geringerer Befall mit *Botrytis cinerea*. Auch kellerwirtschaftlich gibt es Vorteile, so zeichnen sich die kleinbeerigen Klone durch einen höheren Schalenanteil aus, wodurch Anthocyan- und Tanningehalte im Wein erhöht werden (Schmid et al. 2019).

Ein statistischer Unterschied zwischen den Spätburgunder Klonen in der Samenvitalität konnte mit dem TZ Test nicht ermittelt werden. Beim kompakten, aufrechten und lockerbeerigen Klon überwogen die toten Embryonen, beim kleinbeerigen Klon waren es die abnormalen Embryonen. Nach ELIAS ET AL. (2012) sollten für den Test zwei bis vier Wiederholungen mit je 100 Samen durchgeführt werden. Dies kann der Grund dafür sein, dass keine Unterschiede festgestellt werden konnten, da die Stichprobengröße zu gering war. Aufgrund des erheblichen Zeitaufwands war jedoch ein größerer Stichprobenumfang nicht möglich. Außerdem ist es möglich, dass der Embryo unwissentlich verletzt wurde und deshalb nicht angefärbt wurde (Lott 1969). Daher kann bestätigt werden, dass der TZ Test eine hohe Erfahrung und viel Training des Analysierenden erfordert (Elias et al. 2012).

5.3 Topfrebenversuch

5.3.1 Phänologische Entwicklung

Sorte Mitschurinski: Varianten 1 und 3

Die phänologische Entwicklung der Freiland Topfrebe weicht eindeutig von der der warmen Variante ab. Während der Austrieb noch recht nah aneinander lag, hat sich die Entwicklung der Topfrebe 3.1 im Gegensatz zu den anderen drei immer weiter verzögert. So erstreckte sich die Blüte (ES60-ES69) über 13 Tage. Diese Beobachtung lässt sich durch den starken Abfall der Temperatur während dieser Zeit erklären. Die Tagesmittelwerte lagen in der Zeit vom Anfang der Blüte bis zur Vollblüte der Topfrebe 3.1 häufig um 10°C, teilweise wurden Minimum Temperaturen von 2°C erreicht. Aufgrund der tiefen Temperaturen platzen kaum Staubbeutel auf (Currell et al. 1983). Es kann bestätigt werden, dass die Blüte sich länger hinzieht, je ungünstiger die Witterung ist (Vasconcelos et al. 2009).

Die Blüte der Topfreben der warmen Variante läuft sehr schnell ab, innerhalb von drei bis vier Tagen ist die Blüte vollständig abgelaufen. Je höher die Temperaturen sind, desto schneller öffnen sich die Blüten (May 2004; Vasconcelos et al. 2009). Dies kann man

deutlich bei der warmen Variante 1.1 bis 1.3 feststellen. Laut CURRLE ET AL. (1983) wirken sich Temperaturen über 32°C schädlich auf die Blüte aus. Dies konnte nicht bestätigt werden, da die Blüte normal verlief, wenn auch sehr schnell. Grund dafür könnte sein, dass im Gewächshaus nicht nur eine hohe Temperatur um 35°C herrschte, sondern auch eine hohe Luftfeuchtigkeit. Denn laut VASCONCELOS ET AL. (2009), sind vor allem zu hohe Temperaturen in Kombination mit einer geringen Luftfeuchtigkeit unter 45%, schädlich für die Blüte. Doch im Gewächshaus schwankte die Luftfeuchtigkeit meistens um 70%. Nur an einem Nachmittag fiel die Luftfeuchte kurzzeitig auf 45%, jedoch stieg sie danach direkt wieder auf über 77% an (vgl. Abb. 25).

Sorte Phönix: Varianten 2 und 4

Auch bei den Freiland Topfreben der Sorte Phönix weicht die phänologische Entwicklung deutlich von denen der moderaten Variante ab. Hier ist auch schon der Beginn des Austriebs ca. zwei Wochen später, da die Reben für den Austrieb nicht im Gewächshaus standen, sondern von Anfang an im Freiland. Damit der Knospenaufbruch stattfindet, müssen Tagesmitteltemperaturen von ungefähr 8-10°C herrschen (Keller 2010). Ab dem 05.04.2020 lagen die Tagesmitteltemperaturen über 10°C, teilweise lagen sie schon fast bei 17°C wie am 09.05.2020. Die zwei Freiland Topfreben erreichten das Stadium des Knospenaufbruchs schließlich am 14.04.2020. Im weiteren Verlauf verzögert sich die vegetative Entwicklung der Freiland Topfreben weiter, sodass das ES57 ca. einen Monat später erreicht wird als bei der moderaten Variante. Regnet es während der Blüte, öffnen sich die Blüten schlechter und unregelmäßig, oft lösen sich auch die Käppchen nicht richtig ab und bleiben kleben (May 2004). Da es bei der Topfrebe T4.2 nur in die abgehende Blüte geregnet hat und es davor trocken und warm war, hatte der Niederschlag jedoch keinen Einfluss mehr auf den Verlauf der Blüte.

5.3.2 Pollenlebensfähigkeit

Die Lebensfähigkeit der Pollen der Sorte Mitschurinski, die durch die Alexanderlösung ermittelt wurde, ist sehr hoch. Die IFC ermittelte generell geringere Lebensfähigkeitsraten, vor allem bei der Topfrebe 3.1 ist der Unterschied sehr groß. Hier ergab die IFC eine Lebensfähigkeit der Pollen von 5,4%. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis der Pollenkeimung, bei T3.1 lag diese im Mittel bei 1,2% und bestätigt, dass es einen Zusammenhang zwischen Pollenlebensfähigkeit und Pollenkeimung gibt (Tello et al. 2018).

Im Gegensatz dazu passt die hohe Pollenlebensfähigkeit, die die Alexanderlösung ergeben hat, nicht zu der sehr geringen Keimungsrate.

Die Lebensfähigkeit der Pollen der Sorte Phönix lässt sich als hoch beschreiben. Sie liegt zwischen 82% (T2.3) und 86,7% (T2.4). Die Pollen der Freiland Variante T4.1 zeigen sich nicht weniger lebensfähig als die der moderaten Variante, da sie auf gleichem Niveau liegt wie die der Pollen der Topfrebe 2.1.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der Alexanderlösung und der IFC, vor allem im Fall der Topfrebe 3.1, muss der Verdacht von RODRIGUEZ-RIANO UND DAFNI (2000) bestätigt werden. Diese berichteten, dass die Alexanderlösung vermutlich auch tote Pollenkörner anfärbt. Eine Möglichkeit der Überprüfung wäre vorher die Färbung an einer negativen Kontrolle, wie z.B. abgetöteten Pollen durchzuführen. So könnte man sich absichern, dass die Färbung funktioniert (Rodriguez-Riano und Dafni 2000). Eine tote Kontrolle kann man z.B. herstellen, indem der Pollen Temperaturen von 40-60°C für 15 Minuten ausgesetzt wird (Heidmann et al. 2016).

5.3.3 Pollenkeimungsfähigkeit

Die Keimungsrate der Pollen der Freiland Topfrebe liegt mit 1,2% deutlich unter den Keimungsraten der Pollen der warmen Variante 1.1 bis 1.3, die vor und während der Blüte im Gewächshaus standen. Die Keimungsrate der Pollen der Topfrebe 3.1 ist signifikant kleiner als die der Topfreben 1.1 und 1.2 sowie sehr signifikant kleiner als die der Topfrebe 1.3. Damit unterscheidet sich die Pollenkeimungsrate aller Reben der warmen Variante signifikant von der der Freiland Variante. Der Pollen ist während der Mikrosporogenese, der Pollenreifung und der Befruchtung anfällig gegenüber Temperaturstress, auch wenn es nur eine kurze Kälteperiode ist (Luria et al. 2019). Diese Anfälligkeit spiegelt sich in den geringen Keimungsraten der Pollen der Topfrebe 3.1 wider, dessen Pollen während der Entwicklung und Reifung immer wieder Kälteperioden ausgesetzt waren. Laut STAUDT (1982) reagieren die Pollenkörner besonders empfindlich auf Kälte während der Pollenreifung kurz vor dem Aufblühen. Er stellte eine Reduktion der Pollenfertilität auf 5-15% fest, nachdem die Temperaturen 10-13°C zwei bis sechs Tage vor Blütenöffnung betragen (Staudt 1982). Diese Beobachtung kann beim Freilandtopf 3.1 bestätigt werden. Drei bis fünf Tage vor dem Aufblühen betragen die Tagesmitteltemperaturen an der Hochschule zwischen 12,9°C und 14,5°C. am 26.04. und 27.04. lagen die

Tagesminimalwerte sogar bei 3,7 und 3,9°C (Baus und Ehlig 2021). Diese kurzen Kälteperioden scheinen den Großteil der Pollen keimungsunfähig gemacht zu haben. Auch die Lebensfähigkeitsrate der IFC zeigt, dass die Kälte dem Pollen geschadet und in seiner Entwicklung gestört hat, sodass nur ein sehr geringer Prozentsatz lebensfähig ist. STORME UND GEELEN (2014) nennen als anfälligste Phase des männlichen Gametophyten bei Pflanzen gegenüber abiotischem Stress die des frühen Mikrosporenstadiums. Sowohl für die Entwicklung als auch für die Keimungsfähigkeit des Pollenkorns sind Kohlenhydrate sehr wichtig. Leiden die Pflanzen unter Stress, lagert sich weniger Stärke und löslicher Zucker in den Antheren ein. Diese durch Stress hervorgerufenen reduzierten Zuckerreserven in den Antheren werden als hauptsächlicher Faktor angesehen, der männliche Sterilität bei Pflanzen hervorruft. Grund dafür ist ein geringerer Zuckermetabolismus einerseits und eine geringere Assimilatzufuhr andererseits. Durch den abiotischen Stress wird die fotosynthetische Aktivität verändert und der Export von Assimilaten in Bedarfsorgane wie z.B. der Anthere sinkt. Gleichzeitig sind Enzyme, die in den Zuckermetabolismus involviert sind, weniger aktiv und die Kohlenhydratversorgung der Antheren sinkt (Storme und Geelen 2014). Grund für die geringe Keimungsrate der Pollen der Topfrebe 3.1 war also der abiotische Stress durch die kalten Temperaturen, wodurch die Kohlenhydratversorgung der Antheren und damit der Pollenkörner nicht gewährleistet werden konnte. Kalte Temperaturen traten nicht nur während der Mitose auf, sondern auch während der Meiose, die etwa zwei Wochen vor Blütenöffnung stattfindet (May 2004). Während dieser Zeit lagen die Tagesmitteltemperaturen an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter 10°C (Baus und Ehlig 2021).

Bei der Sorte Phönix konnte kein Unterschied in der Pollenkeimungsrate zwischen den Varianten festgestellt werden. Wahrscheinlich ist dies damit zu begründen, dass die Temperaturen während und kurz vor der Blüte beider Varianten nicht so stark voneinander abwichen wie bei den anderen zwei Varianten der Mitschurinski Töpfe. Bei beiden Varianten war die Temperatur zwei Wochen vor der Blüte sowie kurz vor Blütenöffnung in einem Bereich, der sich nicht schädlich auf die Pollenentwicklung und Pollenreifung auswirkt. Im Gewächshaus mit den moderaten Temperaturen schwankten die Temperaturen zwei Wochen vor der Blüte zwischen etwa 20°C und 26°C (s. Abb. im Anhang). Einige Tage vor Blütenöffnung der Topfreben 2.1 bis 2.4 herrschten Temperaturen um die 28°C (s. Abb. im Anhang). Eine ausbleibende Kälteperiode begünstigte somit die Pollenreifung. Im Freiland lagen die Temperaturen zwei Wochen vor Blütebeginn tagsüber zwischen 22°C und

35°C (s. Abb. im Anhang). In drei Nächten fiel die Temperatur kurz unter 7°C, jedoch scheint es keinen Einfluss gehabt zu haben, da die Temperatur tagsüber immer sehr hoch war. Auch kurz vor Blütenöffnung herrschten im Freiland warme Temperaturen zwischen 25°C und 32°C (s. Abb. im Anhang).

Bezüglich der Pollenkeimungsrate muss festgehalten werden, dass die errechnete Keimungsrate nichts über den tatsächlichen Befruchtungserfolg aussagt (Wagner 1962). Grund dafür ist, dass die Pollenschläuche *in vitro* häufig ein schlechteres Wachstum zeigen als *in vivo*. Dies hängt mit den Wechselbeziehungen zwischen Pollenschlauch und Narbengewebe zusammen, welches vom Pollenschlauch durchwachsen wird (Staudt 1982).

Um den Einfluss der Temperatur genauer zu betrachten, wäre es sinnvoll einen Versuch mit drei Temperaturvarianten und einer Sorte zu machen. So könnte man zur warmen und moderaten Variante Versuche in einem kalten Gewächshaus durchführen, um unter kontrollierten Bedingungen den Einfluss der Temperatur auf die Keimungsfähigkeit der Pollen zu untersuchen. Außerdem wurde als Keimungsmedium eine 10%ige Zuckerlösung verwendet. Nach den Ergebnissen der Untersuchungen zur Pollenkeimungsrate in unterschiedlichen Zuckerlösungen anhand verschiedener Sorten, empfiehlt es sich jedoch eine 15%ige Zuckerlösung als Keimungsmedium zu verwenden, da hier für alle Sorten hohe Keimungsraten erreicht wurden.

5.3.4 Reproduktive Parameter

Trotz der geringen Keimungsrate und der geringen Lebensfähigkeitsrate der Pollen der Freiland Topfrebe 3.1 zeigten die Trauben signifikant höhere Anzahl an Gesamtbeeren im Vergleich zur Probe des JKI sowie eine sehr signifikant höhere Anzahl als T1.1. Die Ergebnisse decken sich mit der Anzahl der samenhaltigen Beeren, da die Trauben von T3.1 mehr samenhaltige Beeren aufgrund der höheren Gesamtbeerenanzahl besitzen. Hier wird bestätigt, dass die Keimungsrate *in vitro* nichts über den tatsächlichen Befruchtungserfolg aussagt (Wagner 1962). Grund dafür ist, dass die Pollenkörner auf der Narbe unter natürlichen Bedingungen besser keimen als auf künstlichen Medien. Außerdem ist in der Natur ein Überschuss an Pollenkörnern gegeben, sodass auch bei einer Keimungsrate von 5% noch genügend keimungsfähige Pollenkörner vorhanden sind (Wagner 1962). Somit lässt sich auch der Fruchtansatz der Topfrebe 3.1 signifikant vom Fruchtansatz der Topfrebe 1.2 unterscheiden und sehr signifikant vom Fruchtansatz der Topfrebe 1.1. So beträgt der

Fruchtansatz bei der Freiland Variante 46,7% im Gegensatz zu 14,6% bzw. 18,2% bei T1.1 und T1.2 (vgl. Tab. 5).

Während der Blüte der Topfrebe 3.1 herrschte eine kalte Witterung, in der Zeit von der Blütenöffnung bis zur Vollblüte betragen die Tagesmitteltemperaturen zwischen 9,8°C und 14,2°C, nur an einem Tag erreichten die Temperaturen 17°C. Das Tagesminimum lag an drei Tagen unter 3°C (Baus und Ehlig 2021). Laut VASCONCELOS ET AL. (2009) reduziert sich die Pollenkeimungsfähigkeit sehr stark, wenn es zum Beginn der Blüte sehr kalt wird (Temperaturen zwischen 10 und 13°C). In den ersten drei Tagen lagen die Tagesmitteltemperaturen zwischen 9,8 und 12,4°C im Freiland. Auch KELLER (2010) stellt fest, dass es bei 15°C bis zu 48 Stunden dauern kann, bis die Befruchtung erfolgt ist. Sinken die Temperaturen noch weiter, kann es passieren, dass die Pollenschläuche ihr Wachstum einstellen oder die Samenanlagen zu spät erreichen (Keller 2010). Diese Aussagen können in diesem Fall nicht bestätigt werden, da bei der Topfrebe 3.1 die Befruchtung erfolgreich war und der Fruchtansatz mit fast 50% als normal bezeichnet werden kann (Baby et al. 2016). Auf der anderen Seite ist die Fruchtbarkeitsrate pro Traube von T3.1 signifikant kleiner als die der Topfreben 1.1 und 1.2. Dies könnte bestätigen, dass das Pollenschlauchwachstum langsam war und so weniger Samenanlagen pro Beere befruchtet wurden. Im Schnitt besaßen die Beeren der Freiland Topfrebe 1,8 Samen und damit signifikant weniger Samen als T1.2 (vgl. Tab. 5).

Auch zu hohe Temperaturen über 32°C bzw. über 35°C wirken sich negativ auf Befruchtung und Fruchtansatz aus (Dry et al. 2010; May 2004). Die Varianten 1.1 bis 1.3 waren solch hohen Temperaturen während der Blüte ausgesetzt, der signifikant geringeren Fruchtansatzes von T1.1 und T1.2 im Gegensatz zu T3.1 lässt sich also vermutlich auf eine schlechtes Pollenschlauchwachstum und damit auf eine geringere Befruchtung zurückführen. Gleichzeitig muss beachtet werden, dass die Kontrollprobe des JKI ebenso wie die Topfrebe 1.1 signifikant weniger Gesamtbeeren besaß als T3.1. Die sehr lockere Traubenstruktur könnte also auch auf die Sorte zurückzuführen sein. Allgemein gilt die Tafeltraube Mitschurinski als verrieselungsanfällig, was bestätigt werden kann (Sven Taraba 2021).

Die Aussage von EBADI ET AL. (1996), dass tiefe Temperaturen von 12°C zum Beginn der Blüte zu einer geringeren Anzahl an funktionsfähigen Nichtschwimmer Samen führen, kann

nicht bestätigt werden. Zwischen der Anzahl der Nichtschwimmer Samen der Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Pollenkeimungsrate der Phönix Topfreben unterschied sich nicht zwischen den Varianten. Bei den reproduktiven Parametern gibt es jedoch signifikante Unterschiede. So haben die Freiland Varianten 4.1 und 4.2 weniger Gesamtbeeren im Gegensatz zu zwei Topfreben der moderaten Variante (T2.4 und T2.1). In dem Zusammenhang haben sie auch weniger samenhaltige Beeren, da die Gesamtbeerenanzahl geringer ist. Die Temperaturen während der Blüte der zwei Freiland Topfreben der Sorte Phönix waren im mitteloptimalen Bereich. Sie lagen im Mittel zwischen 15,9°C und 20,9°C. Es gab jedoch Tagesminimum Temperaturen zwischen 6°C und 8,4°C (Baus und Ehlig 2021). Diese können sich negativ auf die Befruchtung ausgewirkt haben, auch wenn es schädlicher ist, wenn die durchschnittliche Temperatur so tief liegt (May 2004; Dry et al. 2010). Auch die Gesamtzahl an Samen ist bei den Freiland Topfreben signifikant kleiner, was darauf schließen lässt, dass das Pollenschlauchwachstum und die Befruchtung nicht optimal verliefen. Ebenfalls signifikant unterscheidbar ist der Millerandage Index der Freiland Varianten, was sich an der hohen Anzahl an samenlosen Beeren im Zusammenhang mit einer geringen Gesamtbeerenanzahl manifestiert. Außerdem lag die Tagesmitteltemperatur zwei Tage vor Blütenöffnung des Topfes 4.1 bei 13°C und 13,6°C (Baus und Ehlig 2021). Diese kurze Kälteperiode kann die Pollenkeimfähigkeit beeinträchtigt haben (Vasconcelos et al. 2009). Somit sind Gesamtbeerenanzahl und Gesamtsamenanzahl reduziert worden.

Im Gegensatz dazu war die Temperatur im Gewächshaus der moderaten Variante besonders in der kritischen Phase zur Blütenöffnung höher, hier lag die Temperatur tagsüber zwischen 20°C und 30°C und pendelte sich meist um 26°C ein (vgl. Abb. im Anhang). Als Optimum wird eine Temperatur zwischen 20°C und 25°C angesehen, die in diesem Fall vorlag (Keller 2010). Bei einer Temperatur von 27-28°C ist laut VASCONCELOS ET AL. (2009) die Pollenkeimungsrate am höchsten.

Auch bei der Anzahl der Nichtschwimmer gibt es signifikante Unterschiede, zwischen der Freiland Topfrebe 4.2 und der moderaten Variante, aber auch innerhalb der moderaten Variante. Bei T4.2 ist in diesem Zusammenhang die geringe Gesamtsamenanzahl zu nennen, weshalb auch die Zahl der Nichtschwimmer gering ist. Es scheint keinen Zusammenhang

zwischen Temperatur zum Beginn der Blüte und der Zahl der Nichtschwimmer zu geben, wie EBADI ET AL. (1996) vermuteten.

Bezüglich der Anzahl lebender grüner Fruchtknoten lässt sich T2.1 signifikant von den anderen unterscheiden, da dieser mit einer Anzahl von 19 sehr viele besitzt. Diese grünen Fruchtknoten entstehen durch die hormonelle Stimulierung des Pollenschlauchwachstums, sie haben jedoch keinen Embryosack aufgrund fehlender Befruchtung (Friend et al. 2009).

5.3.5 Tetrazolium Test

Bei beiden Sorten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten in der Vitalität der Embryonen. Hier kann erneut die zu geringe Stichprobenmenge ein Problem gewesen sein, weshalb es zu keiner statistischen Aussage kommt (vgl. S.68).

Die Topfreben wurden nach Ablauf der sechs Wochen nach Blütebeginn noch einmal auf Gewächshaus und Freiland aufgeteilt, da laut LOTT (1969) die nachfolgende Periode kaum Einfluss auf die Kernfertilität ausübt. Da bei der Kernfertilität keine Unterschiede gefunden wurden, kann auch hierzu keine Aussage getroffen werden.

Insgesamt war die Anzahl der lebenden Samen und Embryonen bei allen untersuchten Samen sehr niedrig, ein Grund dafür könnte die Dormanz der Samen sein. Laut BUSO ET AL. (2015) kann der TZ Test nicht zwischen toten und tief in der Dormanz steckenden Samen unterscheiden. Diese haben eine so geringe metabolische Aktivität, dass sie sich nicht anfärben, obwohl sie lebendig sind. Ein Vorschlag wäre die farblosen Samen mit einer weiteren Vitalitätsfärbung anzufärben, wie z.B. Evans Blue, um so eine bessere Evaluierung des physiologischen Zustands des Samens vornehmen zu können (Busso et al. 2015). Auf der anderen Seite versprechen offizielle Quellen zu Verfahren der Samenvitalitätstestung, dass der TZ Test lebende Samen anhand der Aktivität der Dehydrogenase-Enzyme identifizieren kann, unabhängig vom Grad der Dormanz (Elias et al. 2012; Elias und Garay 2004).

Beim Färben mit TTC wurde nach der Beschreibung von CONNER (2008) vorgegangen: der Samen wurde längs aufgeschnitten, um den Embryo freizulegen. Dann wurde der halbe Samen in einer 0,5%igen TTC Lösung für zwei Stunden bei 40°C belassen, danach konnte die Färbung beurteilt werden (Conner 2008). Im Gegensatz dazu sieht die Anweisung der

International Seed Testing Association (Leist und Krämer 2003) vor, den Samen vor der Färbung zu einem Drittel am oberen Ende abzuschneiden. Dann wird der Samen für 24 Stunden bei 30°C in einer 1%igen TTC Lösung gefärbt. Im Anschluss wird der Samen längs aufgeschnitten, der Embryo freigelegt und die Färbung kann daraufhin beurteilt werden (Leist und Krämer 2003). Es ist möglich, dass diese Vorgehensweise bessere Ergebnisse erzielt, aufgrund von Zeitmangel wurde die kürzere Version von CONNER (2008) gewählt. Es ist auch möglich, dass die Vorgehensweise von CONNER (2008) nur für *Vitis rotundifolia* Samen geeignet ist, da die Experimente an *Vitis rotundifolia* Kernen durchgeführt wurde. Es wäre sehr wichtig in einem weiteren Experiment beide Vorgehensweisen zu vergleichen, um die beste Methode zur Vitalitätsprüfung von *V. vinifera* Samen in zukünftigen Versuchen anwenden zu können.

Zusammenfassung

Die Blütezeit der Rebe ist eine stark temperaturabhängige Periode, die Temperatur beeinflusst wie schnell sich die Blüten öffnen und damit die Dauer der Blüte (May 2004). Gleichzeitig ist das Pollenschlauchwachstum von der Temperatur abhängig: je niedriger die Temperaturen sind, desto länger dauert es, bis die Befruchtung erfolgt. Sind die Temperaturen zu gering, stellen die Pollenschläuche ihr Wachstum ein, bzw. erreichen die Samenanlagen zu spät (Keller 2010). Der Einfluss der Temperatur auf die Blüte konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Bei sehr hohen Temperaturen im Gewächshaus von 32°C lief die Blüte innerhalb von drei bis vier Tagen ab. Im Gegensatz dazu fiel die Blüte der Mitschurinski Freiland Topfrebe in eine kalte Periode. Dies hatte zur Folge, dass die Blüte sich über 13 Tage erstreckte. Auch vor der Blüte, während der Entwicklung und Reifung der Pollenkörner, gab es im Freiland kurze Kälteperioden. Diese führten zu einer sehr geringen Keimungsrate der Pollen der Freiland Topfrebe 3.1. Die Lebensfähigkeit dieser Pollen war der IFC nach zu urteilen ebenfalls sehr gering. Da die Alexanderfärbung in dem Fall keine verminderte Lebensfähigkeit feststellen konnte, wird davon ausgegangen, dass die IFC eine sehr gute und verlässliche Methode zur Überprüfung der Pollenlebensfähigkeit darstellt. Die Untersuchungen der Mitschurinski Topfreben zeigte außerdem deutlich, dass die *in vitro* Keimungsrate der Pollen nichts über die tatsächliche Befruchtung aussagt. So hatte die Freiland Topfrebe trotz der sehr geringen *in vitro* Keimungsrate signifikant mehr Beeren als die Kontrolle vom JKI sowie die Topfrebe 1.1.

Bezüglich gängiger Keimungsmedien konnte gezeigt werden, dass Pollenkeimungsmedien mit zugesetzter Borsäure nicht für alle Rebsorten eine verstärkte Stimulierung des Pollenschlauchwachstums bedeutet. Es kann festgehalten werden, dass sich für eine einheitliche Überprüfung der Pollenkeimungsfähigkeit verschiedener Rebsorten am besten eine reine Zuckerlösung mit 15% Saccharose eignet.

Die Pollenlebensfähigkeit variiert innerhalb der Rebsorten sowie innerhalb verschiedener Klone einer Sorte (Tello et al. 2018). Bezüglich der Spätburgunder Klone konnten dieselben Beobachtungen gemacht werden die auch TELLO ET AL. (2018) bei verschiedenen Tempranillo Klonen machten. So unterschied sich die Lebensfähigkeit der Pollen des kompakten Klons signifikant von der des lockerbeerigen und des kleinbeerigen Klons. Genauso verhält es sich mit der Pollenkeimungsrate. Die verminderte Pollenfertilität des

lockerbeerigen und kleinbeerigen Klons führt zu der charakteristischen Traubenstruktur. So besaßen die Trauben des kleinbeerigen Klons viele kleine, samenlose Beeren und die Trauben des lockerbeerigen Klons hatten weniger Gesamtbeeren, was zu einer lockeren Traubenstruktur führt.

Die anfängliche Hypothese, dass die ersten sechs Wochen ab Blühbeginn einen großen Einfluss auf die Kernfertilität hat, konnte nicht bestätigt werden, da es beim Tetrazolium Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten gab. Es kann festgehalten werden, dass sich die Vorgehensweise der TTC Färbung nach CONNER (2018) für *V. vinifera* Samen nicht zu eignen scheint. Für eine Absicherung der Ergebnisse wären jedoch weitere Versuche notwendig.

6 Literaturverzeichnis

Alva, Orlando; Roa-Roco, Rosa Nair; Pérez-Díaz, Ricardo; Yáñez, Mónica; Tapia, Jaime; Moreno, Yerko et al. (2015): Pollen Morphology and Boron Concentration in Floral Tissues as Factors Triggering Natural and GA-Induced Parthenocarpic Fruit Development in Grapevine. In: *PloS one* 10 (10), 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0139503.

Baby, T.; Gilliam, M.; Tyerman, S. D.; Collins, C. (2016): Differential fruitset between grapevine cultivars is related to differences in pollen viability and amine concentration in flowers. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 22 (1), S. 149–158. DOI: 10.1111/ajgw.12191.

Baus, Ottmar; Ehlig, Andreas (2021): Tagesauswertungen der Wetterstationen. Hg. v. Hochschule Geisenheim University. Institut für Phytomedizin. Geisenheim. Online verfügbar unter <https://rebschutz.hs-geisenheim.de/wetterstationen/tagesauswertung.php>, zuletzt geprüft am 11.05.21.

Busso, C.; Torres, Y.; Ithurrart, L.; Richards, J. H. (2015): The TTC-technique might not appropriately test the physiological stage of plant tissues. In: *Russ J Plant Physiol* 62 (4), S. 551–556. DOI: 10.1134/S1021443715040068.

Cadot, Yves; Miñana-Castelló, Maria Teresa; Chevalier, Michel (2006): Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 54 (24), S. 9206–9215. DOI: 10.1021/jf061326f.

Conner, Patrick J. (2008): Effects of Stratification, Germination Temperature, and Pretreatment with Gibberellic Acid and Hydrogen Peroxide on Germination of ‘Fry’ Muscadine (*Vitis rotundifolia*) Seed. In: *Horticultural Science* 43 (3), S. 853–856.

Currle, Otto; Bauer, Otmar; Hofäcker, Werner; Schumann, Fritz; Frisch, Wolfgang (1983): *Biologie der Rebe. Aufbau, Entwicklung, Wachstum*. Neustadt an der Weinstrasse: Meininger.

Dry, P. R.; Longbottom, M. L.; McLoughlin, S.; Johnson, T. E.; Collins, C. (2010): Classification of reproductive performance of ten winegrape varieties. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16 (1), S. 47–55. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00085.x.

Ebadi, A.; May, Peter; Coombe, B. G. (1996): Effect of short-term temperature and shading on fruit-set, seed and berry development in model vines of *V. vinifera*, cvs Chardonnay and Shiraz. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2, S. 1–8.

Elias, Sabry G.; Copeland, Lawrence O.; McDonald, Miller B.; Baalbaki, Riad Z. (2012): Seed Testing. Principles and Practices. East Lansing, Ann Arbor, Michigan: Michigan State University Press; ProQuest.

Elias, Sabry G.; Garay, A. (2004): Tetrazolium, a fast reliable test to determine seed viability. Oregon State University Seed Laboratory. Corvallis. Online verfügbar unter <http://seedlab.oregonstate.edu/publications>, zuletzt geprüft am 12.05.21.

França-Neto, José de Barros; Krzyzanowski, Francisco Carlos (2019): Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. In: *J. Seed Sci.* 41 (3), S. 359–366. DOI: 10.1590/2317-1545v41n3223104.

Friend, A. P.; Trought, M.C.T.; Creasy, G. L. (2009): The influence of seed weight on the development and growth of berries and live green ovaries in *Vitis vinifera* L. cvs. Pinot Noir and Cabernet Sauvignon. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15 (2), S. 166–174. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00050.x.

Gerrath, Jean; Posluszny, Usher; Melville, Lewis (2015): Taming the Wild Grape. Botany and Horticulture in the Vitaceae. 1st ed. 2015. Cham: Springer International Publishing; Springer International Publishing AG.

Gutermuth, Timo (2016): Identifizierung und Charakterisierung des Signalweges zur Aktivierung von Anionenkanälen während des Pollenschlauchwachstums. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg.

Heidmann, Iris; Di Berardino, Marco (2017): Impedance Flow Cytometry as a Tool to Analyze Microspore and Pollen Quality. In: Anja Schmidt (Hg.): Plant germline development. Methods and protocols. New York, NY: Humana Press (Springer protocols, 1669), S. 339–354.

Heidmann, Iris; Schade-Kampmann, Grit; Lambalk, Joep; Ottiger, Marcel; Di Berardino, Marco (2016): Impedance Flow Cytometry: A Novel Technique in Pollen Analysis. In: *PLoS one* 11 (11), e0165531. DOI: 10.1371/journal.pone.0165531.

Hemmerich, Wanja (2021): Lexikon. Bonferroni-Korrektur. Hg. v. Wanja Hemmerich. Wiesbaden. Online verfügbar unter <https://statistikguru.de/lexikon/bonferroni-korrektur.html>, zuletzt geprüft am 21.05.2021.

Kassemeyer, H. H.; Staudt, G. (1981): Über die Entwicklung des Embryosacks und die Befruchtung der Reben. In: *Vitis* 20 (3), S. 202–210.

Kassemeyer, H. H.; Staudt, G. (1982): Cytologische Untersuchungen über die Ursachen des Verrieselns bei *Vitis*. In: *Vitis* 21 (2), S. 121–135.

Kassemeyer, H. H.; Staudt, G. (1983): Über das Wachstum von Endosperm, Embryo und Samenanlagen von *Vitis vinifera*. In: *Vitis* 22 (2), S. 109–119.

Kelen, Mustafa; Demirtas, Ismail (2003): Pollen viability, germination capability and pollen production level of some grape varieties (*Vitis vinifera* L.). In: *Acta Physiologiae Plantarum* 25 (3), S. 229–233.

Keller, Markus (2010): The science of grapevines. Anatomy and physiology. 1. Aufl. Amsterdam: Academic Press.

Kliewer, W. M. (1977): Effect of high temperatures during the bloom-set period on fruit-set, ovule fertility, and berry growth of several grape cultivars. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 28 (4), S. 215–222.

- Korkutal, Ilknur; Bahar, Elman; Carbonneau, Alain (2019): Early water stress effects on pollen viability, berry set and embryo development in cv. 'Syrah' (*Vitis vinifera* L.). In: *Hort. Sci. (Prague)* 46 (4), S. 215–223. DOI: 10.17221/110/2018-HORTSCI.
- Lebon, G.; Duchêne, E.; Brun, O.; Clément, C. (2005): Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. In: *Annals of botany* 95 (6), S. 943–948. DOI: 10.1093/aob/mci108.
- Lebon, G.; Wojnarowicz, G.; Holzapfel, B.; Fontaine, F.; Vaillant-Gaveau, N.; Clément, C. (2008): Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: *Journal of experimental botany* 59 (10), S. 2565–2578. DOI: 10.1093/jxb/ern135.
- Leist, N.; Krämer, S. (2003): ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing. Tree and Shrub Species. 2 Bände.
- Lorenz, D. H.; Eichhorn, K. W.; Bleiholder, H.; Klose, R.; Meier, U.; Weber, E. (1994): Phänologische Entwicklungsstadien der Reben (*Vitis vinifera* L. spp. *vinifera*): Codierung und Beschreibung der erweiterten BBCH-Scala. In: *Viticulture Enology Scientific* 49 (2), S. 66–70.
- Lott, Heinz (1969): Über die Samenkeimung bei *Vitis vinifera* Sorten und Nachkommen aus interspezifischen Kreuzungen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen. Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung.
- Luria, Gilad; Rutley, Nicholas; Lazar, Itay; Harper, Jeffery F.; Miller, Gad (2019): Direct analysis of pollen fitness by flow cytometry: implications for pollen response to stress. In: *The Plant journal* 98 (5), S. 942–952. DOI: 10.1111/tpj.14286.
- May, Peter (2000): From bud to berry, with special reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6 (2), S. 82–98.
- May, Peter (2004): Flowering and fruitset in grapevines. Adelaide: Lythrum Press.

Padureanu, Silvica; Patras, Antoanela (2018): Palynological characterization, germination potential and pollen tube growth of direct producer hybrids *Noah* and *Othello* (*Vitis* genus). In: *Flora* 240, S. 58–67. DOI: 10.1016/j.flora.2018.01.005.

Pratt, Charlotte (1971): Reproductive anatomy in cultivated grapes - A review. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 22, S. 92–109.

Ristic, Renata; Iland, Patrick G. (2005): Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (1), S. 43–58.

Rodriguez-Riano, Tomas; Dafni, Amots (2000): A new procedure to assess pollen viability. In: *Sexual Plant Reproduction* 12, S. 241–244.

Schenk, Walter (1979): Die Stellung der Rebe im Pflanzensystem. In: Bruno Götz und Waldemar Madel (Hg.): Deutsches Weinbaujahrbuch. Waldkirch: Waldkircher Verlagsgesellschaft, S. 17–22.

Schmid, Joachim; Manty, Frank; Lindner, Bettina (2019): Geisenheimer Rebsorten und Klone. 3. Aufl. Geisenheim (Geisenheimer Berichte, [Bd.] 90).

Schopfer, Peter; Brennicke, Axel (2010): Pflanzenphysiologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.

Schwarz, Jürg; Käch, Wenja; Enzler, Heidi. B. (2020): Methodenberatung. Kruskal-Wallis-Test. Hg. v. Jürg Schwarz. Universität Zürich. Online verfügbar unter https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/kruskal.html, zuletzt geprüft am 21.05.2021.

Srinivasan, Chinnathambi; Mullins, Michael G. (1981): Physiology of Flowering in the grapevine - a review. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 32 (1), S. 47–63.

Staudt, G. (1982): Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum *in vivo* bei *Vitis* und die Abhängigkeit von der Temperatur. In: *Vitis* 21 (3), S. 205–216.

Staudt, G.; Kassemeyer, H. H. (1984): Entstehen kleine Beeren bei *Vitis vinifera* durch Parthenocarpie? In: *Vitis* 23 (3), S. 205–213.

Storme, Nico de; Geelen, Danny (2014): The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. In: *Plant, cell & environment* 37 (1), S. 1–18. DOI: 10.1111/pce.12142.

Sven Taraba (2021): Tafeltraube "Mitschurinski". Hg. v. Sven Taraba. Leipzig. Online verfügbar unter <https://www.fassadengruen.de/tafeltraube-mitschurinski.html>, zuletzt geprüft am 20.05.21.

Tello, Javier; Montemayor, María Ignacia; Forneck, Astrid; Ibáñez, Javier (2018): A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: evaluation of inter- and intra-cultivar diversity in grapevine. In: *Plant methods* 14 (3), S. 1–17. DOI: 10.1186/s13007-017-0267-2.

Vasconcelos, Carmo M.; Greven, Marc; Winefield, Chris S.; Trought, Mike C.T.; Raw, Victoria (2009): The Flowering Process of *Vitis vinifera*: A Review. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 60 (4), S. 411–434.

Wagner, E. (1960): Die Feststellung des Geschlechts bei Rebensämlingen. In: *Vitis* 2 (4), S. 190–197.

Wagner, E. (1962): Gewinnung von *Vitis*-Pollen für Kreuzungszwecke. In: *Vitis* 3 (3), S. 117–129.

Weiler, Elmar W.; Nover, Lutz (2008): Allgemeine und molekulare Botanik. 30 Tabellen. Stuttgart: Thieme.

7 Anhang

Der Anhang befindet sich auf dem beigefügten Datenträger.

Anhang I: Pollenlebensfähigkeit Vergleich Alexanderfärbung und IFC

Anhang II: Datum Durchführung Alexanderfärbung und IFC

Anhang III: Vergleich Pollenkeimung bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen

Anhang IV: Vergleich Pollenkeimung bei verschiedenen Keimungsmedien

Anhang V: Pinot Noir Klone Keimungsrate

Anhang VI: Reproduktive Parameter Pinto Noir Klone

Anhang VII: Tetrazolium Test Pinot Noir Klone

Anhang VIII: Phänologische Eckdaten der Topfreben

Anhang IX: Topfrebenversuch Alexanderfärbung in Zählkammer und IFC

Anhang X: Topfrebenversuch Keimungsraten

Anhang XI: Topfrebenversuch Reproduktive Parameter

Anhang XII: Topfrebenversuch Tetrazolium Test

Anhang XIII: Ergebnisse IFC von Acepo

Anhang XIV: ISTA Arbeitsanleitung TZ-Test

Anhang XV: Tagesauswertungen Wetterstation Hochschule Geisenheim

Anhang XVI: Temperaturmessungen USB-Datenlogger

Anhang XVII: Beispielbilder Pollenkeimungen

Anhang XVIII: p-Werte der statistischen Tests