
Sektion 33 - Molekulare Phytomedizin / Diagnose- und Nachweisverfahren

33-1 - Dierker, L.; von Bargaen, S.; Büttner, C.

Humboldt-Universität zu Berlin

Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen im Wirt-Pathogen-System *Arabidopsis thaliana*/Cherry leaf roll virus

Identification of protein-protein-interactions in the host-pathogen-system Arabidopsis thaliana/Cherry leaf roll virus

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) der Gattung Nepovirus ist weltweit in einer Vielzahl krautiger und holziger Wirtspflanzenarten vertreten. Die natürliche Verbreitung kann vertikal durch das Saatgut und horizontal durch den Pollen erfolgen. Etwa 20 % aller Pflanzenviren sind durch das Saatgut übertragbar (Maule and Wang, 1996), so dass dieser Übertragungsweg eine große epidemiologische Relevanz besitzt. Die molekularen Mechanismen sind bisher nur wenig untersucht. Untersuchungen aus dem Jahr 2009 konnten eine Übertragung von CLRV durch das Saatgut von *Arabidopsis thaliana* über mehrere Generationen nachweisen (Rumbou et al., 2009). Es wird vermutet, dass neben dem viralen Transportprotein (MP, 385 aa, 42 kDa) auch das Hüllprotein (CP, 512 aa, 56 kDa) an der Ausbreitung in der Pflanze beteiligt ist.

Zur Identifizierung von pflanzlichen Proteinen, die an den multiplen Virus-Pflanze-Interaktionen während der Infektion des meristematischen Gewebes und der Samenentwicklung beteiligt sind, wird das Hefe Zwei-Hybrid System (YTHS) in Verbindung mit dem Modellsystem CLRV/*A. thaliana* verwendet. Beide viralen Proteine wurden als Köder zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek von *A. thaliana* cv. Columbia (Nemeth et al., 1998) eingesetzt. Bisher wurden 37 potentiell positive pflanzliche Interaktionspartner des CLRV-MP über Selektion mit den Reporter genen HIS3 und LacZ gefunden. In ersten Untersuchungen mit dem viralen CP wurden zwei Transformanten positiv auf die Reporter gene getestet. Plasmide, die für potentielle pflanzliche Interaktionspartner kodieren, werden aus Hefe isoliert und sollen nach Sequenzierung mittels Daten-bankabgleich (NCBI) identifiziert werden. Zudem konnte eine spezifische Interaktion des Proteins At-4/1 aus *A. thaliana* mit dem CLRV-MP, nicht aber mit dem CP detektiert werden. Das Protein At-4/1 ist sowohl mit dem Endoplasmatischen Reticulum assoziiert als auch an den Plasmodesmata lokalisiert und vermittelt spezifisch den intra- und interzellulären Transport des *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, Paape et al., 2006). Beide Viren nutzen die MP-vermittelte Ausbreitung in der Wirtspflanze entlang tubulärer Strukturen, so dass gleiche Transportmechanismen denkbar sind.

Literatur:

- MAULE, A.J., WANG, D., 1996: Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology* 4, 153-158.
- NEMETH, K., SALCHERT, K., PUTNOKY, P., BHALERAO, R., KONCZ-KALMAN, Z., STANKOVIC-STANGELAND, B., BAKO, L., MATHUR, J., OKRESZ, L., STABEL, S., GEIGENBERGER, P., STITT, M., REDEI, G.P., SCHELL, J., KONCZ, C., 1998: Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 12, 3059-3073.
- PAAPE, M., SOLOVYEV, A.G., EROKHINA, T., MININA, E.A., SCHEPETILNIKOV, M.Y., LESEMAN, D.-E., SCHIEMAN, J., MOROZOV, S.Y., KELLMANN, J.-W., 2006: At-4/1, an interactor of the *Tomato spotted wilt virus* movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 874-883.
- RUMBOU, A., VON BARGEN, S., BÜTTNER, C., 2009. A model system for plant-virus interaction – infectivity and seed transmission of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology* 124, 527-532.

33-2 - Robel, J.¹⁾; Dieckmann, L.¹⁾; Mühlbach, H.-P.²⁾; von Bargaen, S.¹⁾; Büttner, C.¹⁾

¹⁾ Humboldt-Universität zu Berlin

²⁾ Universität Hamburg

Genetische Variabilität der Nucleocapsidprotein (p3)- und der p4-kodierenden Genomregion des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) aus *Sorbus aucuparia* L. verschiedener europäischer Standorte

Genetic variability of the nucleocapsid protein (p3)- and p4-coding region of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) in Sorbus aucuparia L. of various European regions

Das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) konnte 2005 mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziiert werden (Benthack et al., 2005), wenig später wurde das gesamte Genom charakterisiert (Mielke und Mühlbach, 2007). Jede RNA des viergeteilten ss(-)RNA-Genoms kodiert für ein Protein. Durch Sequenzver-

gleiche gelang die Zuweisung der möglichen Funktionen der Proteine, die von den ersten drei RNAs kodiert werden. Die RNA4 kodiert für ein Protein (p4, 233 aa), das keine Sequenzähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen aufweist. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem Protein um ein Transport-Protein handelt, das an der systemischen Ausbreitung in der Pflanze bzw. bei der Übertragung durch die als Vektor vermutete Gallmilbe *Phytoptus pyri* beteiligt sein könnte.

Bisher wurde die Variabilität des Nucleocapsid (NC)-kodierenden Genombereichs (RNA3) von EMARaV-Varianten verschiedener Standorte in Finnland und Russland untersucht und eine hohe Konservierung des Nucleocapsids (97 - 99 %) gezeigt (Kallinen et al., 2009, Valkonen und Rännäli 2010). Analog dazu wird die Variabilität des p4 untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen diskutiert.

In den Jahren 2010 und 2011 wurden Proben von Ebereschen verschiedener europäischer Standorte mit charakteristischen Symptomen entnommen und die RNA3 sowie die p4-kodierende Genomregion mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA amplifiziert. Die generierten Produkte von insgesamt achtzehn Ebereschen wurden im Anschluss sequenziert und die Variabilität des Nicht-Strukturproteins p4 mit der Variabilität des NC-Proteins von EMARaV auf Nucleotid- und Aminosäureebene verglichen.

Literatur

- BENTHACK, W., MIELKE, N., BÜTTNER, C., MÜHLBACH, H.-P., 2005: Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Arch Virol* 150:37-52.
- KALLINEN, A. K., LINDBERG, I. L., TUGUME, A. K., VALKONEN, J. P. T., 2008: Detection, Distribution, and Genetic Variability of *European mountain ash ringspot-associated virus*. *Phytopathology* 99, 344-352.
- MIELKE, N., MUEHLBACH, H.-P., 2007: A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J Gen Virol* 88, 1337-1346.
- VALKONEN, J. P. T., RÄNNÄLI, M., 2010: First Report of *European mountain ash ringspot-associated virus* in *Sorbus aucuparia* from Eastern Karelia, Russia. *Disease Notes* 94 (7), 921.

33-3 - Nutz, S.; Rabenstein, F.; Kühne, T.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Entwicklung einer immunologischen Nachweismethode für Kartoffelviren mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz

Development of an immuno-based detection method for potato viruses via Surface Plasmon Resonance

Der Nachweis von Viren in Pflanzkartoffeln mittels ELISA (Enzyme-linked Immunoassay) ist das immunologische Standardverfahren im Zertifizierungsprozess. Allerdings kann mit einem ELISA immer nur ein Pathogen pro Reaktion nachgewiesen werden. Zudem ist dieser Nachweis zeitaufwändig, da mehrstündige Einwirkzeiten der Antikörper- und Blockierungslösungen sowie die Inkubation der zu untersuchenden Probe über Nacht in den meisten Protokollen vorgesehen sind.

Eine alternative Methode, die spezifische Bindung von Viruspartikeln an homologe Antikörper zu detektieren, stellt die Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR)-Technologie dar. Dabei werden die spezifischen Antikörper an eine Goldfläche auf einem Chip gebunden. Wird virushaltiger Pflanzensaft über diesen Chip gespült, werden die Viruspartikel von den Antikörpern gebunden: hierdurch erhöht sich die Schichtdicke auf der Goldfläche, zudem kommt es dort zu einer Änderung des Brechungsindex. Während einer Messung mit einem SPR-Spektrometer wird gerichtetes Licht in einem bestimmten Winkel von unten auf die Goldfläche gestrahlt. Dadurch kommt es zur Anregung freier Elektronen an der Oberfläche des Metallionengitters, welche kollektiv zu schwingen beginnen. Diese Schwingungen werden als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Die Frequenz dieser Schwingungen wird vom Brechungsindex und von der Schichtdicke der auf der Oberfläche der Metallfläche gebundenen Substanz beeinflusst. Änderungen der Schwingungsfrequenz, beispielweise durch Anbindung eines Viruspartikels an den homologen Antikörper auf der Metalloberfläche, können mit einem SPR-Spektrometer gemessen werden. So wird ein immunologischer Virusnachweis möglich, bei dem die Herstellung markierter Antikörper entfällt. Durch den direkten Nachweis der Bindung des Antigens an den Antikörper ist ein Nachweis innerhalb von 1 bis 2 h möglich, da die Inkubations- und Reaktionsschritte entfallen, die beim ELISA nötig sind.

Bei Verwendung von Mehrkanal-Flusszellen können parallel verschiedene Antikörper auf einem Chip immobilisiert werden. Dadurch wird der simultane Nachweis mehrerer Pathogene, so z. B. von verschiedenen Kartoffelviren in einer Probe möglich.

Nach Etablierung eines entsprechenden Regenerierungsverfahrens bestünde zudem die Möglichkeit, einen Chip mehrfach zu nutzen.

In dem vorgestellten Assay wurde mittels Protein A die Goldfläche des SPR-Chips mit homologem polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen das *Potato virus X* (PVX) funktionalisiert und Presssaft von PVX- infizierten Pflanzen mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 µl/s über den Chip gespült. Ein deutliches Signal war auf den Flächen messbar, welche mit homologem Antikörper funktionalisiert worden waren. Auf den Referenzflächen, auf welchen heterologe Antikörper immobilisiert wurden, konnte keine oder nur eine geringe Signalerhöhung gemessen werden. Die Empfindlichkeit des Nachweises konnte durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers noch erhöht werden. Hierbei wurde zunächst der virushaltige Pflanzen- Presssaft über den Chip gespült. Anschließend wurde ein weiterer spezifischer Antikörper über den Chip gespült, der seinerseits an die gebundenen Viruspartikel bindet. Dadurch konnte die Schichtdicke weiter erhöht und so die Empfindlichkeit gesteigert werden. Am Beispiel des PVX wurde so ein Nachweissystem optimiert, mit dem das Virus in Presssaft infizierter Pflanzen innerhalb 2 h nachgewiesen werden kann.

33-4 - Pastrik, K.-H.¹⁾; Steinbach, P.²⁾

¹⁾ Landwirtschaftskammer Niedersachsen

²⁾ Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

Nachweisverfahren in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten der Kartoffel, Teil 1: Entwicklung und Validierung der qPCR als Knollentest

Detection methods in post harvest official testing of seed potatoes for viral diseases, Part 1: Development and validation of a qPCR-method for tubertesting.

In der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten bei Pflanzkartoffeln wird gegenwärtig der ELISA-Test als Standardverfahren angewendet. Dabei wird ein Nachweis aus dem Blatt von Augenstecklingen bzw. aus Knollenkeimen geführt, da die zu testenden Viren zunächst angereichert werden müssen. Ein sicherer Nachweis der Viren direkt aus den Kartoffelknollen ist aufgrund der zu geringen Nachweisempfindlichkeit des ELISA-Tests nicht möglich. Die Prüfungsdauer je Kartoffelprobe (100 Knollen) beträgt bei diesem Verfahren ca. 6 bis 7 Wochen. Um die Konkurrenzfähigkeit der deutschen Pflanzgutproduktion zu gewährleisten, ist eine Verkürzung der Testdauer bei Export-Proben anzustreben.

Durch die Anwendung sensitiverer Nachweismethoden wie z. B. der quantitativen PCR (qPCR) kann eine Verkürzung der Testdauer erreicht werden. Im Pflanzenschutzamt Hannover wurde in Zusammenarbeit mit der Virusprüfung-Gülsow (LALLF, Mecklenburg/Vorpommern) ein qPCR-Test entwickelt, der die Untersuchung auf die wesentlichen Kartoffelviren PVY, PLRV und PVS direkt aus der Kartoffelknolle umfasst. Im Unterschied zum ELISA-Standardverfahren wird beim qPCR-Test die Kartoffelprobe in Probenpools zu 10 x 10 Knollen untersucht. Der qPCR-Test umfasst zwei unterschiedliche Multiplex-qPCR-Untersuchungen. In der einen Multiplex-Reaktion wird auf die Viren PVY und PLRV getestet, in der anderen erfolgt ein Nachweis von PVS bei gleichzeitiger Amplifikation einer internen PCR-Kontrolle (Cox).

In Pilotuntersuchungen wurde die Richtigkeit der qPCR-Ergebnisse validiert. Dazu wurden 26 Routine-Kartoffelproben aus der Beschaffenheitsprüfung von Pflanzkartoffeln sowohl mit dem ELISA-Standardverfahren als auch mit dem entwickelten qPCR-Test untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte eine hohe Übereinstimmung beider Verfahren trotz der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte. Weiterhin konnte durch den Einsatz der qPCR eine starke Verkürzung der Testdauer erreicht werden.

33-5 - Steinbach, P.¹⁾; Pastrik, K.-H.²⁾

¹⁾ Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

²⁾ Landwirtschaftskammer Niedersachsen

Nachweisverfahren in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten der Kartoffel, Teil 2: Vergleichsuntersuchungen zu ELISA-Standardverfahren und q-PCR

Detection methods in post harvest official testing of seed potatoes for viral diseases

Part 2: Comparison study for ELISA methods and qPCR

Gemäß Pflanzkartoffelverordnung (PflKartV) wird in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten als Bestandteil des Anerkennungsverfahrens von Pflanzkartoffeln der Besatz mit den Kartoffelviren PLRV, PVY, PVA, PVM, PVX und PVS ermittelt. Das erfolgt bundesweit einheitlich mittels Labortestung im ELISA-Verfahren (Standardverfahren) an Augenstecklingspflanzen bzw. vereinzelt an Knollenkeimen (Ausnahme: Z-Pflanzgut kann durch visuelle Symptombestimmung zertifiziert werden). Infolge der Anzucht von Augenstecklingspflanzen

im Gewächshaus und der anschließenden Laboruntersuchung beträgt die Untersuchungsdauer ca. 6 bis 7 Wochen. Der Virusnachweis direkt an der Knolle könnte demgegenüber eine Zeitersparnis bedeuten.

Von 2008 bis 2010 wurde das Verfahren ELISA an der Knolle nach Behandlung mit Rindite (Gugerli, 1979) gegenüber dem Standardverfahren hinsichtlich der Nachweissicherheit für PLRV, PVY, PVM und PVS an 47 offiziellen Pflanzkartoffelpartien a 112 Knollen je Probe vergleichend geprüft. Außerdem erfolgten in den Jahren 2010 und 2011 an 7 Proben a 100 Knollen vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von PLRV, PVY und PVS zwischen den ELISA-Testverfahren und dem für die schnellere Ergebnisbereitstellung bei Exportproben entwickelten qPCR-Verfahren.

Bei den geprüften ELISA-Methoden konnte das derzeit in Europa bedeutendste Kartoffelvirus PVY aus Knollensaft in Keimnähe häufiger und sicherer nachgewiesen werden als im Blattsaft beim Standardverfahren der Augenstecklingsprüfung. Der Nachweis von PLRV und PVM gelang in beiden ELISA-Testverfahren gleichwertig gut. Durch den Knollentest konnte die Prüfungsdauer um bis zu 14 Tage verkürzt werden.

Das entwickelte qPCR-Verfahren zeigte für PLRV, PVY und PVS trotz deutlich früherem Testtermin und Pooluntersuchung eine sehr hohe Nachweissicherheit. Es lag eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Poolergebnisse mit den im ELISA festgestellten Kartoffelviren vor.

Abschließend werden die Anwendungsmöglichkeiten der geprüften Knollenteste in der Beschaffenheitsprüfung im Rahmen der Anerkennung von Pflanzkartoffeln diskutiert.

33-6 - Stammler, G.¹⁾; Miessner, S.¹⁾; Schutte, T.²⁾

¹⁾ BASF SE

²⁾ Citrus Research International, South Africa

Phyllosticta-species on Citrus: Species differentiation and sensitivity to QoI fungicides

Citrus black spot, caused by *Phyllosticta citricarpa*, is responsible for substantial losses in citrus in Africa, Asia, America and Australia, affecting all citrus cultivars. According to recent publications several *Phyllosticta* species are known to occur on citrus, which include *P. citricarpa*, *P. citriasiana*, *P. capitalensis*, *P. citribraziliensis* and *P. citrichinaensis* (1). Only *P. citricarpa* and *P. citriasiana* have been proved to be pathogenic, while others are non-pathogenic endophytes on citrus. *P. citricarpa* is the most important pathogen, while *P. citriasiana* has so far only been found on *Citrus maxima* in Asia (2). *P. capitalensis* is a species which is often isolated from citrus fruits, but represents an endophytic, non-pathogenic species on citrus. The aim of the present study was to identify the risk of the three most important species, *P. citricarpa*, *P. citriasiana* and *P. capitalensis*, to become resistant to QoIs. Strains were isolated from different Citrus hosts and identified by morphological and molecular genetic characteristics (4) followed by a comparison with reference isolates from the CBS, Utrecht. The analyses showed a high intraspecific homogeneity but interspecific differences.

All isolates of *P. citricarpa* and *P. citriasiana* were highly sensitive in microtiter tests to the QoI pyraclostrobin, more sensitive than isolates of *P. capitalensis*. EC₅₀ values of field isolates were in narrow ranges and comparable to the corresponding reference isolates within the three different species, which indicates that an adaptation to QoIs has not yet occurred. Analysis of the target gene of QoIs, the cytochrome *b*, revealed that no isolate had amino acid exchanges at positions which are known to reduce QoI sensitivity (codons 129, 137, 143). Additionally, an intron sequence directly after the codon 143 is present in all isolates of *P. citricarpa*. Based on the experiences with other "intron-pathogens" (e.g. *Pyrenophora teres*, *Monilinia laxa*) the occurrence of the G143A mutation, the mutation with highest impact on QoI sensitivity, is rather unlikely (4). Such an intron could not be found for *P. citriasiana* and *P. capitalensis*, which means that the G143A mutation could be expected after high selection pressure as it has been found in other plant pathogens. As precautionary measurements, resistance management strategies should be followed also for *P. citricarpa* especially by limitation of QoI applications, alternation of fungicides with different modes of action and/or by using efficacious mixing partners. This is even more important in regions and farms in Asia where *P. citriasiana* could be found.

The *Phyllosticta* complex is still under investigation, and recent studies led to several new species descriptions. Our studies showed that the cytochrome *b* gene is a valuable tool for species differentiation and identification. One advantage of this gene is its repetitiveness, since it is part of the mitochondrial DNA (mtDNA). This repetitiveness reduces the detection limit, which is favorable for development of reliable PCR assays. Previous studies have shown that mtDNA is appropriate for species and subspecies identification in various fungal genera (5). In particular the intron sequences associated with the cytochrome *b* gene in *Phyllosticta* provide interesting approaches for identification, differentiation and detection of *Phyllosticta* species. Since identification and differentiation of non-pathogenic and pathogenic *Phyllosticta* species on citrus fruits for EU import is important for a reliable detection of the pathogenic quarantine organisms, the findings of this study can also be helpful in developing efficient diagnostic tools for phytosanitary purposes. Our PCR assay provided an accurate differentia-

tion of *Phyllosticta* species based on PCR product length and a high specificity since no products were observed with other fungal genera. Furthermore the strong PCR signals indicate a high sensitivity and reliability. The method is rapid and simple since results can be obtained with one single reaction.

Literature:

1. GLIENKE, C., PEREIRA, O.L., STRINGARI, D., FABRIS, J., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERESAWA, L., CUNNINGTON, J., SHIVAS, R.G., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W., 2011: Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot. *Persoonia* 26: 47-56.
2. WULANDARI, N.F., TO-ANN, C., HYDE, K.D., DUONG, L.M., DE GRUYTER, J., MEFFERT, J.P., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W., 2009: *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Div* 34: 23-39.
3. PERES, N.A., HARAKAVA, R., CARROLL, G.C., ADASKAVEG, J.E., TIMER, L.W., 2007: Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Dis* 91: 525-531.
4. GRASSO, V., PALERMO, S., SIEROTZKI, H., GARIBALDI, A., GISI, U., 2006: Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci* 62: 465-472.
5. STAMMLER, G., SEEMÜLLER, E., DUNCAN, J.M., 1993: Analysis of RFLPs in nuclear and mitochondrial DNA and the taxonomy of *Phytophthora fragariae*. *Mycol Res* 97: 150-156.

33-7 - Mahlein, A.-K.; Steiner, U.; Dehne, H.-W.; Oerke, E.-C.

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erfassung von Wirt-Pathogen-Interaktionen bei Blattkrankheiten der Gerste mittels hyperspektraler Bildanalyse

Assessment of host-parasite interactions of barley and leaf pathogens using hyperspectral imaging

Pflanzenkrankheiten wirken sich auf die optischen Eigenschaften von Pflanzen aus. In Abhängigkeit des Wirt-Pathogen-Systems und der krankheitsspezifischen Symptome werden verschiedene Bereiche des Reflektionsspektrums beeinflusst. Veränderungen der optischen Eigenschaften von Pflanzen während der Pathogenese können mit hochauflösenden hyperspektralen Kameras zerstörungsfrei erfasst werden. Diese innovativen Sensoren haben ein großes Potential, Unterschiede zu gesundem Gewebe bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung zu detektieren.

Am Modell der Gerste (*Hordeum vulgare*) und den pilzlichen Erregern *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit), *Puccinia hordei* (Zwergrost) und *Blumeria graminis hordei* (Echter Mehltau) wurden Untersuchungen zur Auswirkung der Blattkrankheiten auf die Reflektionseigenschaften von Gerstenblättern gemacht. Mit einem Kamerasystem wurden bis 18 Tage nach der Inokulation täglich hyperspektrale Datensätze von Gerstenblättern erfasst und bildanalytisch ausgewertet. Die spektrale Reflektion wurde im sichtbaren, im Nahinfrarot- und im kurzwelligen Infrarot-Bereich von 400 bis 2500 nm gemessen. Anhand verschiedener spektraler Bereiche wurden biochemische und strukturelle Veränderungen während der Pathogenese erfasst und mit mikroskopischen und analytischen Methoden verglichen. Dieses optische Verfahren ermöglicht es, die Entwicklung von Blattkrankheiten zu charakterisieren und sie in praktischen Anwendungen mittels spektraler Informationen zu detektieren und zu identifizieren.

33-8 - Bürling, K.¹⁾; Hunsche, M.²⁾; Noga, G.²⁾

¹⁾ Industrieverband Agrar e.V.

²⁾ Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erfassung der blau-grün und roten Fluoreszenz an Winterweizen zur Differenzierung zwischen N-Mangel und Pathogeninfektion

Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat

Weltweit wird die Pflanzenproduktion unter anderem durch biotische und abiotische Faktoren, wie Pathogenbefall und Nährstoffmangel, gefährdet. Beispielsweise liegt der potenzielle Ertragsverlust bei Weizen durch pilzliche Erreger unter bestimmten Bedingungen bei bis zu 15 %. In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze zur sensorbasierten Früherkennung von Pflanzenstress verfolgt und z.T. bereits in die Praxis implementiert. Eine frühzeitige, möglichst pre-visuelle, zerstörungsfreie Erkennung einer Stresssituation soll bei der Optimierung der pflanzenbaulichen bzw. Pflanzenschutz-Maßnahmen unterstützen und den ökonomischen Schaden minimieren. Eine Herausforderung stellt in der Anwendung verschiedener Sensortechnologien dabei jedoch immer noch die Differenzierung zwischen zeitgleichem Auftreten verschiedener Stressoren, z. B. eines Pathogenbefalls und einem Stickstoffmangel, dar.

Frühere Untersuchungen an Weizen mit starkem Pathogenbefall sowie ausgeprägtem N-Mangel zeigten, dass die Erfassung der Chlorophyllfluoreszenz (R, FR) eine geeignete Methode zur Stressdifferenzierung sein könnte. Aussagen über eine pre-visuelle Unterscheidung eines zeitgleichen Auftretens von schwach ausgeprägtem N-Mangel und frühen Stadien eines Pathogenbefalls sind bisher jedoch noch unzureichend. Darüber hinaus ist in diesem Zusammenhang das Potenzial der Blau- (B), Grün- (G) und Gelb-Fluoreszenz noch nicht erforscht worden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Differenzierung zwischen der pflanzenphysiologischen Reaktion von Weizen auf einen schwachen N-Mangel und Braunrostbefall (*Puccinia triticina*) mittels UV-induzierter spektraler Fluoreszenzmessung zwischen 370 nm und 800 nm möglich ist.

Unter kontrollierten Bedingungen wurden Versuche an Winterweizen der Sorte 'Ritmo' mit den folgenden Versuchsgruppen durchgeführt: (a) N-Vollversorgung; (b) N-Mangel; (c) N-Vollversorgung + Braunrostinokulation; (d) N-Mangel + Braunrostinokulation. Dabei wurden die Pflanzen entweder mit einer normalen oder einer veränderten Hoagland-Nährflösung versorgt, um eine N-Vollversorgung bzw. einen leichten N-Mangel zu gewährleisten. Am zweiten, voll entwickelten Blatt wurde eine Inokulation mit einer unspezifischen Mischung von Braunrostsporen vorgenommen (Versuchsgruppen „c“ und „d“). Dabei wurden die Blätter fixiert und an standardisiert markierten Stellen 6 µL Tropfen der Sporenlösung appliziert. Die sensorbasierten Messungen wurden mit einer Technik durchgeführt, die die Erfassung UV-laserinduzierter Fluoreszenzspektren im Spektralbereich von 370 bis 800 nm ermöglicht und über eine Auflösung im Nanosekundenbereich verfügt (Laserfluoroskop der IOM GmbH, Berlin). Die Messungen wurden 2 bis 4 Tage nach Inokulation (der Versuchsgruppe „c“ und „d“) an den Applikationspunkten ebenfalls fixierter Blätter vorgenommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass das Amplituden-Verhältnis R/FR eine gute Grundlage sowohl für die Früherkennung (2 Tage nach Inokulation) als auch für eine Differenzierung zwischen den vier Versuchsgruppen darstellt. Darüber hinaus lieferte, auch bereits zu diesem frühen Zeitpunkt, die Blau-Grün-Fluoreszenz in Form des B/G Amplituden-Verhältnis weitere vielversprechende Ansätze für eine mögliche Diskriminierung zwischen den evaluierten multiplen Stressfaktoren. Im Zeitverlauf betrachtet wurde der spektral gemessene Unterschied zwischen gesunden und inokulierten Blättern größer. Vier Tage nach Inokulation konnten visuell die ersten, leicht chlorotischen Flecken beobachtet werden. Neben der Unterscheidung der vier Versuchsgruppen konnten mehrere Amplituden- und Halbwertsbreiten-Verhältnisse für eine Früherkennung der Pathogeninfektion, unabhängig vom Stickstoffversorgungsgrad der Pflanze, als geeignet befunden werden.

In einer vergleichbaren Versuchsreihe an Winterweizen mit dem pilzlichen Erreger des Echten Mehltaus (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, so dass die Fluoreszenzintensität, gemessen zwischen 370 und 800 nm, einen geeigneten Parameter für eine Diskriminierung zwischen Stickstoffmangel und pilzlicher Erkrankung darstellt.