



(12) Anmeldepatent

(11) DD 292 325 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) G 01 N 33/483
G 01 N 21/25
G 01 N 25/18

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD G 01 N / 338 148 7	(22)	26.02.90	(44)	25.07.91
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080, Berlin, DE				
(72)	Koepp, Reinhold, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Hanke, Thomas, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Ebert, Bernd, Dr. sc. nat. Dipl.-Biophys.; Metzger, Ulrich, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DE				
(73)	Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin; Humboldt-Universität, Sektion Physik, O - 1080 Berlin; Martin-Luther-Universität, Sektion Biowissenschaften, O - 4020 Halle, DE				
(74)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(54)	Verfahren zur Bestimmung von Schäden grüner Pflanzen				

(55) Verfahren; Bestimmungsquantitativ; Charakterisierung, kinetisch; Kälteschäden; Hitzeschäden; Immissionsschäden; Temperaturstreß; Schädigungszustand; Selektion; Messung; ESR-spektroskopisch; Photosynthesesignal

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Schäden grüner Pflanzen, bestehend aus der Bestimmung von komplexen Kälte- oder Hitze- und Immissionsschäden an grünen Pflanzen und der Toleranz der Pflanzen gegen derartige Schäden. Das Verfahren ist insbesondere aussagefähig, wenn Immissionsschäden oder andere schädigende Einwirkungen dem Temperaturstreß vorausgegangen sind. Es erlaubt die quantitative Bestimmung und eine kinetische Charakterisierung des Schädigungszustandes von Pflanzenindividuen sowie die Selektion temperatur- und immissionsstreßtolleranter Pflanzen. Erfindungsgemäß werden grüne Pflanzenteile nach ESR-spektroskopischer Messung des Hell/Dunkel-Verhältnisses eines Photosynthesesignals (PS-Signal) einem Kälte- oder Hitzestreß ausgesetzt. Danach wird das gleiche PS-Signal nochmal gemessen und der Anstieg des Hell/Dunkel-Verhältnisses als Maß für die Schädigung genutzt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung von Schäden grüner Pflanzen, bestehend aus der Belastung der Pflanzen durch schädigende Umwelteinflüsse, der Auswahl von Pflanzenteilen und der ESR-spektroskopischen Messung der Photosynthesesignale (PS-Signale) bei Hell/Dunkel-Variation, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Belastung der Pflanzen standardisiert, dabei auch durch Kombination verschiedener schädigender Einflüsse vorgenommen wird, daß Teile der gleichen Pflanze, ggf. des gleichen Bereiches der Pflanze mit und ohne Belastung, oder die gleichen Teile ohne Abtrennung von der Pflanze vor und nach der Belastung zur Messung ausgewählt werden, daß die ESR-spektroskopische Messung der PS-Signale bei Hell/Dunkel-Variation quantitativ, ggf. durch Doppelintegration, vorgenommen wird und bei der Auswertung der Unterschied der Messung mit und ohne Belastung für ein Pflanzenindividuum bzw. für gleiche Teile der Pflanze quantitativ bestimmt wird und, ggf., für eine Pflanzengruppe der Mittelwert und die Schwankungsbreite als quantitative Aussagen in an sich bekannter Weise gewonnen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der schädigende Einfluß eine standardisierte Kälte- oder Hitzebehandlung ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der schädigende Einfluß eine standardisierte Immission von Schadstoffen, insbesondere Schwefel- und Stickoxiden, ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß kombinierte schädigende Einflüsse eine standardisierte Kälte- oder Hitze einwirkung nach oder während einer definierten Schadstoffimmission sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die ESR-spektroskopische Messung der PS-Signale während der Belastung durch die schädigenden Einflüsse vorgenommen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Beurteilung der Wirkung physikalischer und chemischer Streßfaktoren auf grüne Pflanzen benutzt werden.

Anwendungsbereiche dieses Verfahrens sind der Pflanzen- und Umweltschutz, die Land- und Forstwirtschaft sowie der Gartenbau.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bei den bekannten Verfahren werden Schäden durch Luftschadstoffe und andere Schadfaktoren an Pflanzen nach visueller Erfassung von Merkmalen wie Blattnekrosen, Wachstumsdepressionen, Blattverluste beurteilt (Dässler, H. G.; „Einfluß von Luftverunreinigungen auf die Vegetation“, Jena 1981). Aufgrund dieser Beurteilungsmerkmale ist keine vorteilhafte quantitative und/oder Früherkennung möglich.

Zur pflanzenphysiologischen Quantifizierung der Schädigung des Photosyntheseapparates grüner Pflanzen durch zu hohe oder zu tiefe Temperaturen, Trockenheit, Schadgase, schädigende Agrochemikalien, ionisierende Strahlungen und andere Faktoren werden bisher überwiegend Gaswechsellmessungen durchgeführt. Dabei werden in einem geschlossenen Kreislauf die CO₂-Konzentrationen gemessen und der CO₂-Verbrauch als Maß für die Photosyntheseaktivität und damit für die Funktionstüchtigkeit der Pflanzen benutzt. Derartige Bestimmungen können auch mit Hilfe von radioaktiven Isotopen, meist ¹⁴C, oder durch Messung des Sauerstoffverbrauches bzw. der Sauerstoffproduktion mittels Clark-Elektrode vorgenommen werden. In jedem Falle ist zur Messung eine abgeschlossene Gasatmosphäre erforderlich, in die abgeschnittene Pflanzenteile oder Präparationen daraus eingebracht werden müssen. Dies erfordert für jede Einzelmessung einen erheblichen apparativen und zeitlichen Aufwand bei der Probenvorbereitung. Neuere Verfahren zur Bewertung von Einwirkungen auf den Photosyntheseapparat grüner Pflanzen setzen die aufwendige präparative Herstellung von Chloroplasten voraus, mit deren Hilfe dann *in vitro* nach Zusatz von künstlichen Elektronenakzeptoren und/oder -donatoren die Beeinträchtigung der Elektronentransportkapazität als Maß für die Pflanzenschädigung ermittelt wird (Metzger, U.: „Untersuchung des photosynthetischen Elektronentransportes isolierter Chloroplasten. Probleme der Ermittlung des Wirkungsmechanismus potentieller Herbizide“, Dissertation, Halle 1981). Auch diese Verfahren bedingen einen erheblichen Arbeitszeit-, Chemikalien- und gerätetechnischen Aufwand.

Solche Verfahren, die durch Erfassen des Lumineszenzlichtes über mehrere Stunden eine Schädigung an Pflanzen nachweisen (Ellinson, J. L., Amundson, R. G.: „Delayed Light Imaging for the Early Detection of Plant Stress“, Science 215, 1104, 1982 und Blach, R., Bachmann, O., Baumberger, I.: „Studies of Photosynthesis Inhibition by Phytoluminography“, Z. Naturf. 37c, 452, 1982) sind überproportional zeitaufwendig und tragen nur qualitativen Charakter.

Ein Fortschritt wurde durch die ESR-spektroskopische Bestimmung der Mn⁺⁺-Konzentration und deren Verwendung zur Bewertung von Schäden im Pflanzenmaterial erreicht („Bestimmungsverfahren für Immissionsschäden und Immissionsresistenz bei Pflanzen“, DD-WP 217636), jedoch wird in grünen Pflanzen Mn⁺⁺ nicht immer in ausreichend hohen Konzentrationen gefunden, und das Verfahren kann nicht generell zur Bewertung der Streßempfindlichkeit angewendet werden. Der Nachweis von Pflanzenschäden anhand der Induktionskurve der Chlorophyllfluoreszenz („Optisches Verfahren zum Nachweis von Schädigungen des Photosyntheseapparates“, DD-WP 248433 A 1) besitzt den Nachteil, daß bei einem Spektrum sehr komplizierter Form, kleine Linienformänderungen als Indikator für die Schädigung herangezogen werden müssen, was schwer quantifizierbar ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Bestimmung von Schäden grüner Pflanzen durch Umwelteinflüsse zur Verfügung zu stellen, das den Arbeitsaufwand und damit die Kosten für die Probenaufbereitung verringert. Damit soll ein wesentlicher Beitrag zum Aufbau vergleichender Tests für das Biomonitoring von Umweltschäden, insbesondere durch langzeitige SO_2 -Einwirkung, und zur Selektion Immissionsstoleranter Pflanzen, die nach Einwirkung der Immission auch anderen in der Natur vorkommenden Streßwirkungen (z. B. Frost, Hitze, Trockenheit) ausgesetzt sein können, erbracht werden, und somit schnelle gesellschaftliche Entscheidungen ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein schnelles und quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Streßempfindlichkeit von Pflanzen gegenüber schädigenden Einflüssen *in vivo* ohne aufwendige Probenpräparation zu entwickeln.

Erfindungsgemäß werden Teile von grünen Pflanzen, in denen der Photosyntheseprozess abläuft und die einem Kälte-, Hitze-, Trocken- oder Immissionsstreß einzeln oder kombiniert ausgesetzt worden sind, ohne weitere Aufbereitung in den Resonator eines ESR-Spektrometers eingebracht, und es wird nach 5 Minuten Dunkelzeit das Dunkelsignal und anschließend bei Anregung mit Licht (einer Beleuchtungsstärke von beispielsweise 100 mW/cm^2) das Lichtsignal der Photosynthese bei einem g-Faktor g 2 aufgenommen. Die Erhöhung des hell/dunkel-Verhältnisses im Vergleich zu dem einer Kontrollprobe (gleiche Pflanze, dem Streß nicht ausgesetzt) ist ein Maß für die eingetretene Schädigung durch Streßwirkung. Die ESR-spektroskopische Untersuchung beansprucht vorteilhafterweise kaum Aufwand zur Probenaufbereitung und auch wenig Meßzeit (z. B. 2 min je Probe). Das erfindungsgemäße Verfahren wird auch auf intakte Pflanzen angewendet, indem Teile davon, z. B. Blattabschnitte, in den Resonator des ESR-Spektrometers gebracht werden, ohne sie von der Pflanze abzutrennen. Damit können vorteilhaft auch Erholungsvorgänge nach Streßeinwirkung an bestimmten Pflanzenindividuen meßtechnisch erfaßt werden.

Aus den erfindungsgemäß gewonnenen Daten läßt sich unter Zuhilfenahme von an sich bekannten Modellvorstellungen über die Mechanismen der Photosynthese der Gehalt der Pflanzenteile an aktiven Photosynthesezentren bestimmen. Damit sind die gewonnenen quantitativen Daten in direkter Weise mit realen zellbiologischen Vorgängen verbunden, die für wirksame Maßnahmen des Umweltschutzes aussagekräftig sind.

Die ESR-spektroskopische Messung selbst stört nicht die Photosynthese, d. h. sie stellt keinen schädigenden Einfluß dar. Während die Meßergebnisse mit oder ohne Belastung für verschiedene Pflanzen recht starken Schwankungen unterliegen, ist der Vergleich beider Messungen für die gleiche Pflanze erfindungswesentlich eine genauere quantitative Bewertung der Schädigung. Hiermit kann in vorteilhafter Weise eine Selektion einzelner geschädigter Individuen durchgeführt werden. Durch die erfindungsgemäße standardisierte Belastung sowie den Vergleich der Hell/Dunkel-Werte bei einem Individuum lassen sich aus den quantitativen Daten mehrerer Individuen einer Gruppe vorteilhaft der Mittelwert und die Schwankungsbreite bestimmen, wobei durch die Verwendung gleicher Pflanzenteile die Schwankungsbreite minimiert wird. Hierdurch ist der Vergleich verschiedener Pflanzengruppen (Sorten, Arten, unterschiedliche Standorte, unterschiedliche Behandlungen) möglich. Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet somit die Bewertung von Pflanzenindividuen bzw. -gruppen hinsichtlich ihrer Toleranz gegen schädigende Einflüsse. Damit verbunden ist die Möglichkeit der Früherkennung besonders sensibler Pflanzenindividuen bzw. -gruppen und deren Aussonderung. Besonders günstig kann das Verfahren zur Selektion kälte-, hitze- und immissionsstoleranter Pflanzen in der Pflanzenzucht angewendet werden.

Ausführungsbeispiel

Zur Bestimmung wurden Blätter der *Festuca arundinacea* benutzt. Die Pflanzen wurden angezchtet in Töpfen unter natürlichen klimatischen Bedingungen. Die Blätter für die Untersuchung wurden kurz vorher von der Pflanze entfernt, der mittlere Bereich in mehrere Stücke gleicher Masse geteilt. Von unbehandelten Abschnitten wurde das ESR-Signal ohne und mit Belichtung gemessen. Die anderen Abschnitte des gleichen Blattes wurden mit den erfindungsgemäßen Streßfaktoren behandelt. Aus der Änderung des ESR-Signals im Vergleich zum unbehandelten Abschnitt wurde eine quantitative Aussage in einer Zeit ermittelt, die im wesentlichen durch die Zeit der Streßbehandlung bestimmt war. Die Messung von Proben verschiedener Blätter der gleichen Art und Pflanze ergaben Abweichungen, die kleiner als 10% waren.