

Universität Bielefeld
Fakultät für Chemie

Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.

ENTWICKLUNG EINES
LABORDEMONSTRATORS ZUR
FERNDETEKTION VON MYKOSEN IM
WEINBAU DURCH LASERINDUZIERTER
FLUORESZENZ

Masterarbeit

Von: Manuel Diedrich

Universität Bielefeld
Fakultät für Chemie

Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.

ENTWICKLUNG EINES
LABORDEMONSTRATORS ZUR
FERNDETEKTION VON MYKOSEN IM
WEINBAU DURCH LASERINDUZIERTER
FLUORESZENZ

Masterarbeit

Von: Manuel Diedrich

Arbeitsgruppe: Institut für Technische Physik
Atmosphärische Propagation und Wirkung

Begutachtung: Prof. Dr. Andreas Brockhinke, Prof. Dr. Thomas Hellweg

Betreuung: Dr. Christoph Kölbl

Zeitraum: 25. April - 25. Oktober 2022

Abgabe: 25. Oktober 2022

Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich einige Worte des Dankes festhalten:

Ich bedanke mich bei Andreas Brockhinke und Thomas Hellweg für die Betreuung meiner Masterarbeit seitens der Fakultät, die Übernahme des Gutachtens und die hilfreichen Anregungen sowie die konstruktive Kritik. Weiterhin gilt mein Dank Manuela Koch vom Prüfungsamt der Fakultät für Chemie, die mir bei allen Fragen rund um meine Studienplanung tatkräftig zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei Christoph Kölbl für die sehr gute Betreuung am DLR. Vielen Dank für all das Vertrauen und die Freiheiten, die ich genießen durfte. Für die hilfreichen Tipps und Unterstützungen, nicht nur im Laboralltag, sondern im ganzen Projekt. Vor allem aber für das Kreieren einer Atmosphäre, in der Kreativität und neue Ideen wertgeschätzt werden. Außerdem möchte ich Frank Duschek für das Ermöglichen meiner Tätigkeit am DLR danken. Mein Dank gilt weiterhin der Arbeitsgruppe TP-APW, für das Schaffen einer tollen und angenehmen Arbeitsumgebung am Standort und die herzliche Aufnahme. Insbesondere möchte ich mich bei Lara Walprecht für die Unterstützung bei den Messkampagnen, bei Elias Ellingen für die tolle Zusammenarbeit am Projekt, bei Thomas Schlagenhauser für die mechanische und handwerkliche Unterstützung (und für die anregenden Gespräche in den Pausen und im Büro), sowie bei Ralf Zimmermann für die Unterstützung bei elektronischen Fragestellungen danken.

Zu guter Letzt geht ein besonderer Dank an meine Mutter, die mir immer mit einem offenen Ohr zur Seite steht, für die Unterstützung in jeglicher Form. Ebenso an meine Partnerin, Freund*innen und alle weiteren tollen Menschen, die in den letzten beiden Jahren hinter mir standen, mir Halt gaben, für die nötige Ablenkung sorgten und mich inspirierten. Danke, dass ihr immer für mich da wart und mich auf meinem Weg begleitet habt, ohne euch wären die letzten beiden Jahre nicht dieselben gewesen!

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und gelieferte Datensätze, Zeichnungen, Skizzen und graphische Darstellungen selbstständig erstellt habe. Ich habe keine anderen Quellen als die angegebenen benutzt und habe die Stellen der Arbeit, die anderen Werken entnommen sind - einschließlich verwendeter Tabellen und Abbildungen - in jedem Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Bielefeld, den 25. Oktober 2022

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alwin Bedner', written in a cursive style.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	2
2.1	Fluoreszenz	2
2.2	Laser	7
2.3	LIF-Spektroskopie	11
2.3.1	Chlorophyll-Fluoreszenz	11
2.4	Pflanzenmykosen im Weinbau	12
2.4.1	Falscher Mehltau	12
2.4.2	Echter Mehltau	12
3	Experimenteller Teil	13
3.1	Aufbau und Charakterisierung des vinoLAS-Labormusters	13
3.1.1	Konstruktion des vinoLAS-Labordemonstrators	13
3.2	Charakterisierung des Lasersystems	20
3.2.1	Leistungsmessungen	20
3.2.2	Spektrale Betrachtungen	20
3.2.3	Bestimmung von Strahlprofilen	20
3.2.4	Untersuchung der Laserpulse am Oszilloskop	21
3.3	Durchführung der Messkampagne	21
3.3.1	Probenmanagement der Topfreben	21
3.3.2	Inokulation	22
3.3.3	Probendokumentation	22
3.3.4	Messvorbereitung	22
3.3.5	Ablauf der Messroutine	23
3.4	Detektion von <i>Plasmopara viticola</i> am Beispiel eines Riesling-Blatts	24
3.5	Statistische Messungen zur Validierung der Methodik	24
3.5.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Mehлтаubefalls	24
3.5.2	Aufnahmen des Mehлтаubefalls mit dem Rasterelektronen- mikroskop	25
3.5.3	Fluoreszenzmessungen der Blattunterseite	25
3.5.4	Anregungsemissionsspektren der Sporangiensuspension im Fluoreszenzspektrometer	25
3.5.5	LIF-Messung der Sporangiensuspension am vinoLAS- Labormuster	25
3.5.6	Fluoreszenzunterschiede auf einem einzelnen Blatt	25
3.5.7	Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz auf Weinblättern	26
3.5.8	Fluoreszenzverhalten bei wiederholter Anregung	26
3.5.9	Bestimmung des Einflusses von Messmarkierungen auf der Blattoberfläche	26
3.5.10	Distanzabhängigkeit der laserinduzierten Fluoreszenz	26

3.5.11	Auswirkungen des Messzeitpunktes zu verschiedenen Tageszeiten	27
3.5.12	Fluoreszenzunterschiede innerhalb einer Rebe	27
3.5.13	Scanmessung einer Weinrebe	27
3.5.14	Feldmessungen im Weinberg	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Charakterisierung des Lasersystems	28
4.1.1	Leistungsmessungen	28
4.1.2	Spektrale Betrachtungen	29
4.1.3	Bestimmung von Strahlprofilen	30
4.1.4	Untersuchung der Laserpulse am Oszilloskop	33
4.2	Detektion von <i>Plasmopara viticola</i> am Beispiel eines Riesling-Blattes	35
4.3	Ergebnisse der Messkampagne	39
4.3.1	Befall der Topfreben	39
4.3.2	Auswertung der LIF-Messungen	40
4.4	Statistische Messungen zur Validierung der Methodik	46
4.4.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Mehлтаubefalls	46
4.4.2	Aufnahmen des Mehлтаubefalls mit dem Rasterelektronenmikroskop	47
4.4.3	Fluoreszenzmessungen der Blattunterseite	48
4.4.4	Anregungsemissionsspektren der Sporangiensuspension im Fluoreszenzspektrometer	49
4.4.5	LIF-Messung der Sporangiensuspension am vinoLAS-Labormuster	50
4.4.6	Fluoreszenzunterschiede auf einem einzelnen Blatt	51
4.4.7	Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz auf Weinblättern	52
4.4.8	Fluoreszenzverhalten bei wiederholter Anregung	53
4.4.9	Bestimmung des Einflusses von Messmarkierungen auf der Blattoberfläche	53
4.4.10	Distanzabhängigkeit der laserinduzierten Fluoreszenz	56
4.4.11	Auswirkungen des Messzeitpunktes zu verschiedenen Tageszeiten	57
4.4.12	Fluoreszenzunterschiede innerhalb einer Rebe	57
4.4.13	Scanmessung einer Weinrebe	58
4.4.14	Feldmessungen im Weinberg	60
4.4.15	Bestimmung des Zustandes von unbekanntem Proben	61
5	Diskussion	63
6	Zusammenfassung	71
7	Literatur	73

1 Einleitung

Pilzkrankungen bedrohen den Jahresertrag von Weinernten des europäischen Weins *Vitis vinifera* in Quantität und Qualität stark. Deshalb erfordert der Weinbau im Vergleich zu anderen Kulturen intensive Fungizidanwendungen.¹ Um den Fungizideinsatz zu verringern, werden im Weinbau verschiedene Techniken und kombinierte Strategien angewandt. Um Ertragsverluste erfolgreich zu reduzieren, sind Techniken zur nicht-invasiven Detektion, sowie zur Überwachung erforderlich.^{2,3} Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Labordemonstrators zur Ferndetektion von Mykosen im Weinbau innerhalb des vinoLAS-Projektes. Es soll abgeschätzt werden, ob eine Detektion von falschem Mehltau durch den Erreger *Plasmopara viticola* durch LIF-Messungen (laserinduzierte Fluoreszenz) an Weinblättern mit dem Demonstrator möglich ist. Zur Fluoreszenzanregung sollen die Laserwellenlängen 236, 355, 473, 532 und 1064 nm zusammen mit einem Scanspiegel zur Abtastung von Rebzeilen genutzt und getestet werden. Zur Detektion von vegetativem Stress und Pilzkrankungen kommen Fluoreszenzmethoden bereits länger zum Einsatz, bisher aber nur in Laboranwendungen oder an anderen Nutzpflanzen als dem Wein.⁴⁻⁶ Eine Auswertung findet häufig anhand von Fluoreszenzindizes statt.⁷ Die vorgestellte Methode ordnet sich mit dem Alleinstellungsmerkmal der Mehrwellenanregung durch ein Lasersystem in die nicht-invasive optische Diagnostik in der Landwirtschaft ein und verspricht bei gegebener Funktion ein Transferpotential zu anderen Nutzpflanzen. Durch den Einsatz von Lasern zur Fluoreszenzanregung können bestehende Methoden, wie z.B. die in der Landwirtschaft etablierte hyperspektrale Bildgebung ergänzt oder erweitert werden.^{2,8} Ein solches System kann als Modelltechnologie für den praktischen Einsatz in Weinbergen dienen und eine Möglichkeit für frühzeitige Maßnahmen gegen pathogene Erreger wie dem falschen Mehltau eröffnen. Die mit dem Einsatz von Fungiziden verbundenen ökologischen und ökonomischen Kosten könnten so erheblich reduziert werden.

Im Rahmen einer Messkampagne soll überprüft werden ob und ab welchem Zeitpunkt nach einer Inokulation ein Befall von Topfreben festgestellt werden kann. Für die insgesamt 30 zu messenden Topfreben soll ein System zum Probenmanagement, sowie eine reproduzierbare Messroutine entwickelt werden. Als Teil dieser Arbeit soll der entwickelte Demonstrator charakterisiert und in der Messkampagne getestet und validiert werden. Weiterhin sollen in einem randomisierten Experiment unbekannte Proben von Weinreben durch LIF-Messungen einem gesunden oder befallenen Zustand zugeordnet werden. Es soll abgeschätzt werden, wie gut sich solch ein optisches System in Feldmessungen im Weinberg nutzen lässt und eine Früherkennung oder Überwachung von Befall möglich ist. Um die gewonnenen Messdaten zu validieren, sollen in dieser Arbeit außerdem Faktoren untersucht werden, welche die Messungen beeinflussen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist die spontane Emission elektromagnetischer Strahlung aus einem angeregten Energiezustand eines Atoms oder Moleküls. Sie kann durch Aufnahme von Fluoreszenzspektren für den Rückschluss auf elektronische Zustände in einem Molekül verwendet werden.

Zur Bestimmung von Fluoreszenzspektren wird die spektroskopische Methode der Fluoreszenzspektroskopie angewandt, welche wie die Absorptionsspektroskopie auf resonanten Energieüberträgen beruht. Der Wellenlängenbereich der elektromagnetischen Strahlung der Absorptionsspektroskopie liegt im Bereich von $\lambda = 300\text{--}800\text{nm}$, bei welchem Valenzelektronen durch die Wechselwirkung mit dem elektrischen Wechselfeld der genannten Strahlung in höhere Energiezustände angeregt werden. Der Anteil der bei diesem Prozess absorbierten Strahlung, die Absorbanz A kann als dekadischer Logarithmus lg des Verhältnisses der Anfangsintensität I_0 und der Strahlungsintensität I nach Durchschreiten der Probe mit dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung **Gleichung 1**) beschrieben werden.⁹

$$A = lg \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Dabei stellt ϵ den wellenlängenabhängigen, molaren Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration der Lösung und d die Schichtdicke der gemessenen Probe dar.

In der Fluoreszenzspektroskopie gibt die Quantenausbeute Φ_F das Verhältnis zwischen absorbierten und emittierten Photonen an. **Gleichung 2** zeigt dieses Verhältnis, wobei I_F die Intensität der emittierten Strahlung und I_A die Intensität der absorbierten Strahlung darstellt.

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad (2)$$

Die Fluoreszenzintensität F_I ist direkt proportional zur Intensität der anregenden Strahlung I_0 .¹⁰

$$F_I = 2.3 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$

Durch der Absorption von Strahlung werden Atome oder Moleküle in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt. Zur quantitativen Beschreibung der Fluoreszenz aus diesem angeregten Zustand, muss die Relaxation zurück in einen Grundzustand durch mehrere Desaktivierungsprozesse beschrieben werden. Diese lassen sich im *Jablonski-Diagramm* (**Abbildung 1**) zusammenfassen, welches ein Energieterm-Schema für die unterschiedlichen Prozesse ist.^{11,12} In den meisten Fällen ist der elektronische Grundzustand ein Singulettzustand (S_0). Angeregte Zustände können Singulett- (S_i) oder Triplett-Zustände (T_i) sein. Eine Anregung in höher liegende Zustände klingt nach kurzer Zeit in den niedrigsten Zustand derselben Multiplizität ab. Dieser Effekt wird interne Konversion genannt.¹³ Das

Jablonski-Diagramm in **Abbildung 1** zeigt neben den elektronischen Niveaus ebenfalls die Schwingungsniveaus eines jeden elektronischen Niveau. Diese Schwingungsniveaus besitzen außerdem Rotationsniveaus, welche zur besseren Übersichtlichkeit jedoch nicht dargestellt sind.¹³

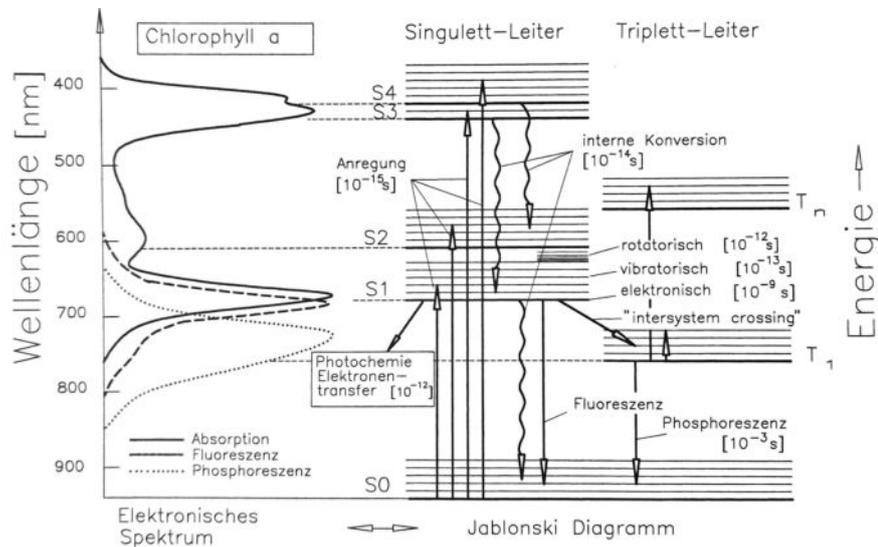


Abbildung 1. Jablonski-Diagramm zur Darstellung von Absorptions- und Emissionsprozessen in einem Molekül am Beispiel von Chlorophyll a. Abgebildet sind die Singulettzustände S_i , sowie die Triplettzustände T_i . Die Lage der Energieniveaus richtet sich in dieser Darstellung nach den Signalen im elektronischen Spektrum von Chlorophyll a aus.¹⁴

In **Abbildung 1** sind ein Absorptions- und Fluoreszenzspektrum eines komplexen Moleküls am Beispiel des Blattfarbstoffs Chlorophyll dargestellt. In photosynthetischen Organismen konvertiert dieser Lichtenergie in chemische Energie.¹⁴ In **Abbildung 1** lässt sich die *Absorption* (Anregung) elektromagnetischer Strahlung mit der Energie E erkennen. Das Molekül wird vom Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand gebracht. Zusätzlich werden auch Schwingungs- (horizontale Linien in **Abbildung 1** und **Abbildung 2**) und Rotationszustände (nicht abgebildet) angeregt. Die *Fluoreszenz* (genauere schematische Darstellung in **Abbildung 2**) beschreibt grundsätzlich die spontane Emission von Licht. Diese Emission ist nur solange gegenwärtig, wie das Molekül auch elektromagnetische Strahlung absorbiert.¹⁴ Es handelt sich um eine kurzlebige Emission im ns-Bereich.¹¹ Das emittierte Fluoreszenzlicht hängt neben der Molekülumgebung auch von den dynamischen Eigenschaften des Moleküls zu diesem Zeitpunkt ab.¹¹ Im Falle der *Resonanzfluoreszenz* emittiert das Molekül elektromagnetische Strahlung im gleichen Maße, d.h. mit der gleichen Energie E und Frequenz ν die es vorher absorbiert hat. Dieser Effekt ist allerdings nur zu beobachten, wenn die angeregte Spezies keine Energie mit der Umgebung austauschen kann.¹² Für die Übergänge gilt die Regel, dass Energie und Drehimpuls erhalten bleiben müssen. Generell wird bei den Übergängen zwischen strahlenden (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) und strahlungslosen Übergängen (interne Konversion, Quenching) unterschieden. Bei strahlenden Übergängen wird ein Photon absorbiert und emittiert. Bei strahlungs-

losen Übergängen wird Energie zwischen den verschiedenen Freiheitsgraden oder an die Umgebung eines Moleküls übertragen. Die beiden beschriebenen Prozesse konkurrieren miteinander.¹³ Befindet sich das Molekül nach der Absorption in einem angeregten elektronischen- und Schwingungszustand, kann die Schwingungsenergie durch Stöße mit benachbarten Molekülen abgegeben werden. Dabei sinkt es in den Schwingungszuständen bis zum Schwingungsgrundzustand (*vibronische Relaxation*) des jeweiligen elektronischen Zustands mit einer Lebensdauer von 10^{-13} Sekunden¹⁴ immer weiter ab (**Abbildung 2**). Dieser Prozess ist ein *strahlungsloser Zerfall*. Da der Energiebetrag vom angeregten bis zum niedrigeren elektronischen Zustand zu groß ist um durch Stöße vom Lösungsmittel aufgenommen zu werden, existiert dieser Zustand mit 10^{-9} Sekunden¹⁴ relativ lange und relaxiert anschließend, wie in **Abbildung 2** zu sehen, durch spontane Emission (*Fluoreszenz*).^{9,12}

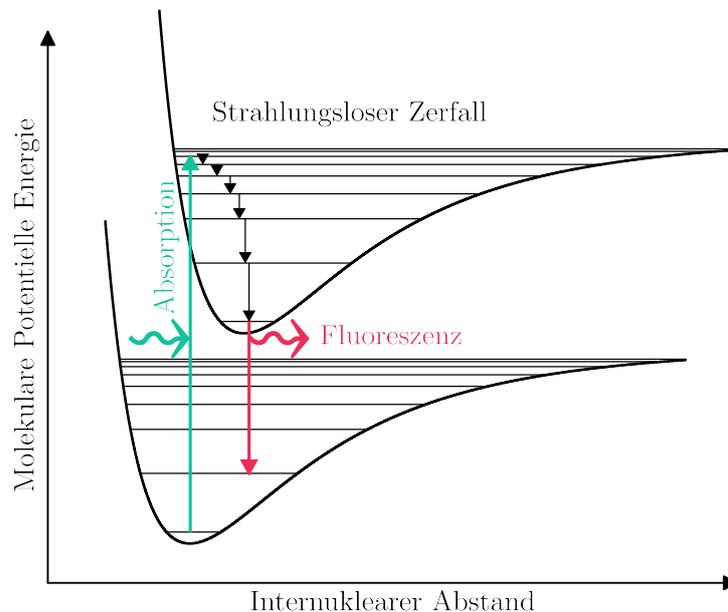


Abbildung 2. Schematische Darstellung des Fluoreszenzmechanismus mit elektronischem Grund- und angeregtem Zustand und den einzelnen Schwingungsniveaus (horizontale Linien). Aufgetragen ist der Bindungsabstand gegen die potentielle Energie. Dargestellt ist der Fall der Absorption und der Fluoreszenz (Radiation), sowie der strahlungslose Zerfall (Radiationless decay). Absorption und Emission erfolgen nach dem *Franck-Condon Prinzip*.¹⁵

Das *Franck-Condon Prinzip* besagt nun, dass wie in **Abbildung 2** zu sehen ist, sowohl Anregung als auch Emission des Moleküls im Energieniveau-Schema vertikal erfolgen.¹⁶

Es ist auch möglich, dass der angeregte elektronische Zustand strahlungslos in einen anderen Zustand gleicher Multiplizität wechselt und von dort aus meistens aus einem angeregten vibronischen Zustand unter Abgabe von Wärme in den vibronischen Grundzustand. Der Spin der Elektronen wird dabei nicht umgekehrt,

also z.B. ein Singulett-Singulett Übergang. Dieser Übergang wird auch *interne Konversion* genannt. **Abbildung 2** zeigt sowohl ein Absorptionsspektrum mit charakteristischer Schwingungsstruktur, als auch ein Fluoreszenzspektrum, welches zu höheren Wellenlängen verschoben ist, aber dem Spiegelbild des Absorptionsspektrums ähnelt. Einzig die 0-0 Schwingungsübergänge besitzen die gleiche Frequenz, bzw. Wellenlänge, da hier das Molekül nur elektronisch angeregt wird. Das Absorptionsspektrum in **Abbildung 3** stellt zunehmende Übergänge 1-0, 2-0, usw. mit abnehmenden Wellenlängen dar, während das Fluoreszenzspektrum (**Abbildung 3**) absteigende Übergänge wie 0-0, 0-1, usw. mit zunehmenden Wellenlängen darstellt. Die Intensitäten des Spektrums werden ebenfalls durch das *Franck-Condon Prinzip* festgelegt (siehe **Abbildung 2**).⁹

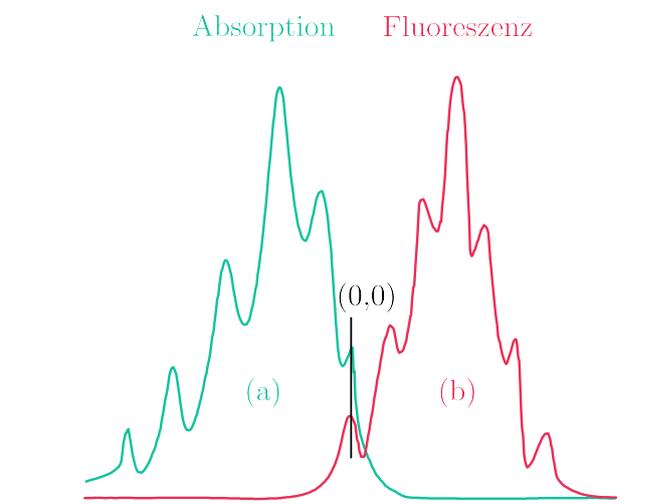


Abbildung 3. Darstellung eines Absorptions- (a) und eines Fluoreszenzspektrums (b) mit charakteristischer Schwingungsstruktur. Aufgetragen ist die Wellenlänge λ gegen die Intensität I des Spektrums. Der 0-0 Übergang liegt in beiden Spektren auf derselben Wellenlänge λ .¹⁵

Durch den Grad der Wechselwirkung mit den Solvenzmolekülen und die Abgabe von Energie durch Stöße mit diesen werden auch die Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls in Lösung beeinflusst. So ist das Fluoreszenzspektrum relativ zum Absorptionsspektrum immer zu geringeren Frequenzen rotverschoben, da das angeregte Molekül erst seine Schwingungsenergie an die Solvenzmoleküle abgibt und erst danach die Emission elektromagnetischer Strahlung erfolgt. Diesen Effekt beschreibt die *Lösungsmittelrelaxation*. Er findet sich im Alltag bei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen wieder. So absorbiert zum Beispiel Fluorescein im ultravioletten bis blauen Bereich und erscheint dem Betrachter als leuchtend grüner Farbstoff.^{9,14} Der *Stokes-Shift* gibt die Wellenlängendifferenz der maximalen Signalhöhen im Absorptions- und Fluoreszenzspektrum an.¹⁴

Durch die zuvor beschriebene Möglichkeit, dass ein Molekül in seinem elektronisch angeregtem Zustand anders mit seiner Umgebung wechselwirkt als das selbe Molekül im Grundzustand (z.B. durch begünstigte Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen) kann es vorkommen, dass sich die Absorptionsbanden des

0-0 Übergangs der Absorptions- und Fluoreszenzspektren (siehe **Abbildung 2**) nicht in der Wellenlänge überschneiden und somit auch einer Verschiebung relativ zueinander unterliegen. Da die Übergänge der Absorption und Fluoreszenz, wie bereits beschrieben, relativ schnell stattfinden, agieren die Lösungsmittelmoleküle in ihrer Beweglichkeit sehr träge um sich einer möglichen, neuen Polarisierung eines Zustandes auszurichten. Das führt dazu, dass Absorption und Fluoreszenz immer in einer typischen Umgebung des vorherigen Zustands stattfinden.⁹ Ursache der unterschiedlichen Wechselwirkung des Moleküls mit der Solvenzumgebung ist eine veränderte Polarisierbarkeit im Molekül, da sich die Elektronenwolke des Moleküls ausdehnt.¹⁴

Durch die genannten Effekte ist das Aussehen der Fluoreszenzspektren sehr abhängig von äußeren Faktoren. So spielen Temperatur, Viskosität und Polarität des Lösungsmittels und vor allem die Änderung von Polaritäten durch äußere Felder eine große Rolle.¹⁴ Die Polarität eines Lösungsmittels führt z.B. dazu, dass ein gelöster, fluoreszierender Stoff in verschiedenen Lösungsmitteln in anderen Farben erscheint.

Außerdem ist es in einigen Fällen möglich, dass das Molekül in seinem angeregten elektronischen Zustand und vibronischem Grundzustand analog zu Fluoreszenz allerdings strahlungslos über verschiedene Mechanismen in einen elektronisch niedrigeren Zustand übergeht. Diesen Prozess der Löschung der Fluoreszenz beschreibt das *Quenching*. Die Energie kann z.B. durch Stöße mit den so genannten *Quenchern* abgegeben werden. Die Fluoreszenz-Löschung unterliegt so sehr stark also auch der Spezies des Lösungsmittels.

Das Phänomen der *Phosphoreszenz* wird bei Verbindungen beobachtet, welche schwere Atome enthalten. Es ist ähnlich wie bei der Fluoreszenz eine spontane Emission nach Anregung zu beobachten, welche allerdings stark verzögert auftritt, da die angeregten Elektronen durch Inter-System-Crossing aus dem Singulett- in einen Triplettzustand übergehen. Die Relaxationszeit aus diesem Zustand zurück in den elektronischen Grundzustand beträgt 10^{-3} Sekunden und kann sogar bis zu Stunden andauern, weshalb dieser Effekt als *Nachleuchten* auch sichtbar nach der Anregung mit elektromagnetischer Strahlung empfunden wird.

Zudem ist es möglich, dass das Molekül in Fällen von großen Energiebeiträgen dissoziiert, wobei keine weiteren spektroskopischen Phänomene außer das Absorptionsspektrum oder mögliche Fluoreszenz oder Phosphoreszenz von Dissoziationsprodukten auffallen. In diesem Fall besitzt das Molekül maximale Schwingungsenergie, die im Verlauf des *Lennard-Jones Potentials* (**Abbildung 2**) in der abflachenden Kurve gegen eine unendliche Bindungslänge läuft und somit einen Bindungsbruch induziert.¹²

2.2 Laser

Laser haben sich seit ihrer Erfindung in den letzten 60 Jahren zu einem wichtigen Forschungsgebiet in der Physik und anderen Fachrichtungen entwickelt. Das Akronym bildet sich dabei aus den Wörtern *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* und beschreibt eine intensive, kohärente Lichtquelle mit einer hohen Monochromasie.¹⁷ Die für einen Laser relevanten, konkurrierenden optischen Prozesse in einem Zwei-Niveau-Energiesystem mit einem Grundzustand E_1 und einem angeregten Zustand E_2 sind in **Abbildung 4** zusammengefasst.

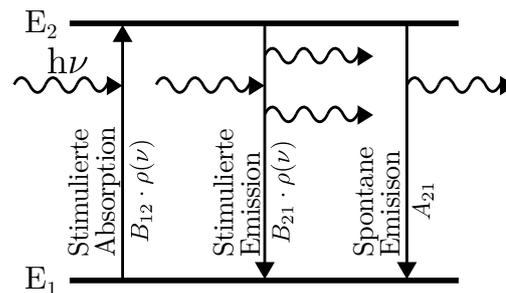


Abbildung 4. Skizze eines der energetischen Prozesse bei der Wechselwirkung eines Zwei-Niveau-Systems mit einem Strahlungsfeld mit den jeweiligen Einstein-Koeffizienten.¹⁸

Ein System, welches sich in einem energetischen Grundzustand E_1 befindet, kann durch stimulierte Absorption von Licht in einen angeregten Zustand E_2 überführt werden. Die Resonanzbedingung in **Gleichung 4** besagt, dass die erforderliche Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen genau der Energie E des einstrahlten Photons entsprechen muss. Dabei ist μ die Frequenz der Strahlung und h das Planck'sche Wirkungsquantum.¹⁹

$$E = E_2 - E_1 = h\nu \quad (4)$$

Die Wahrscheinlichkeit W_{12}^{Stim} , dass ein Photon absorbiert wird, ist proportional zur Zahl der Photonen $h\nu$ am Ort der absorbierenden Spezies und damit proportional zur spektralen Energiedichte $\rho(\nu)$ (**Gleichung 8**) des Strahlungsfeldes.¹⁸

$$W_{12}^{Stim} = B_{12}\rho(\nu) \quad (5)$$

Dabei beschreibt der Proportionalitätsfaktor B_{12} den Einstein-Koeffizient der stimulierten Absorption. Der angeregte Zustand E_2 in einem freien Atom zerfällt im Prozess der Resonanzfluoreszenz, wobei der ursprüngliche Grundzustand E_1 durch spontane Emission von Strahlung der gleichen Frequenz ν der Anregung erreicht wird.¹⁹ Die Wahrscheinlichkeit W_{21}^{Spon} , dass ein Photon spontan emittiert wird, ist unabhängig vom äußeren Feld und hängt nur von der Struktur der Spezies und

dem betrachteten Übergang $E_2 \rightarrow E_1$ ab.¹⁸

$$W_{21}^{Spon} = A_{21} \quad (6)$$

In einem treibenden Strahlungsfeld der gleichen Frequenz ν und der Energiedichte $\rho(\nu)$ wird das freie Atom zu synchronen Schwingungen angeregt und verstärkt das Lichtfeld durch stimulierte Emission.¹⁹ Dieser Prozess unterscheidet sich zur spontanen Emission und ist die Grundvoraussetzung zur Funktion eines Lasers.¹⁷ Das stimulierte emittierte Photon gehört nach Emission zur selben Mode, wie das stimulierende Photon. Die Wahrscheinlichkeit W_{21}^{Stim} , dass eine angeregte Spezies pro Sekunde ein Photon stimuliert emittiert, ist in **Gleichung 7** mit dem Einsteinkoeffizient der stimulierten Emission B_{21} dargelegt.¹⁸

$$W_{21}^{Stim} = B_{21}\rho(\nu) \quad (7)$$

Die spektrale Energiedichte $\rho(\nu)$ ist nach der Planck'schen Strahlungsformel in **Gleichung 8** mit der Boltzmann-Konstante k , der Temperatur T und der Lichtgeschwindigkeit c definiert.¹⁸

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi\nu^2}{c^3} \frac{h\nu}{e^{\frac{h\nu}{kT}} - 1} \quad (8)$$

Die spektrale Energiedichte $\rho(\nu)$ wird auch thermische Strahlung genannt, da sich die spektrale Verteilung bei thermischem Gleichgewicht zwischen Strahlungsfeld und Materie einstellt. Die Gesamtzahl der Teilchen pro Volumeneinheit für einen energetischen Zustand E_i beschreibt die Besetzungsdichte N_i . Im stationären Fall muss die zusammengefasste Absorptionsrate $N_1 B_{12}\rho(\nu)$ gleich der gesamten Emissionsrate $N_2 B_{21}\rho(\nu) + N_2 A_{21}$ sein, wenn die Energiedichte $\rho(\nu)$ des Strahlungsfeldes konstant ist. Als Bilanzgleichung wird **Gleichung 9** erhalten.¹⁸

$$N_1 B_{12}\rho(\nu) = N_2 B_{21}\rho(\nu) + N_2 A_{21} \quad (9)$$

Im thermischen Gleichgewicht gilt für diese Besetzungszahlen N_i eine Boltzmann-Verteilung. Mit den jeweiligen Entartungsgraden g_i ($g_J = 2J + 1$ für die Rotation) kann in **Gleichung 10** das Besetzungsverhältnis zwischen zwei Zuständen N_1 und N_2 beschrieben werden.¹⁸

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{g_2}{g_1} e^{-\frac{E_2 - E_1}{kT}} = \frac{g_2}{g_1} e^{-\frac{h\nu}{kT}} \quad (10)$$

Für einen Übergang mit der Frequenz ν_{21} gilt somit für die spektrale Energiedichte:

$$\rho(\nu_{21}) = \frac{g_2}{g_1} \frac{B_{21}}{B_{12}} \frac{A_{21}}{e^{-\frac{h\nu}{kT}}} \quad (11)$$

Beide Gleichungen der spektralen Energiedichte (**Gleichung 8** und **Glei-**

chung 11) müssen für beliebige Frequenzen ν und Temperaturen T gelten. Ein Vergleich ergibt für die Einstein-Koeffizienten **Gleichung 12** und **Gleichung 13**.¹⁸

$$B_{12} = \frac{g_2}{g_1} B_{21} \quad (12)$$

$$A_{21} = \frac{8\pi \cdot h\nu^3}{c^3} B_{21} \quad (13)$$

Durch **Gleichung 12** wird ausgedrückt, dass für die stimulierte Absorption und Emission die Einstein-Koeffizienten gleich sind, wenn die beiden Zustände E_1 und E_2 statistisch gleich gewichtet werden. Aus **Gleichung 13** wird ersichtlich, dass die Wahrscheinlichkeit der stimulierten Emission W_{21}^{Stim} immer wahrscheinlicher ist, als die Wahrscheinlichkeit der spontanen Emission W_{21}^{Spon} , wenn die Ungleichung **Gleichung 14** gilt.¹⁸

$$\rho(\nu) > \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \quad (14)$$

Damit ist die spontane Emissionsrate in einer Mode immer dann kleiner, als die stimulierte Emissionsrate, wenn das stimulierende Strahlungsfeld in einer Mode mehr als ein Photon enthält.¹⁸ Ob Materie in einem Lichtfeld absorbiert oder emittiert hängt also davon ab, sich mehr Teilchen im Grundzustand oder im angeregten Zustand befinden. Eine Besetzungsinversion ist somit die Grundlage für die stimulierte Emission in einem Lasersystem.¹⁹ Eine Größe, die dieses Verhalten beschreibt ist die Besetzungszahldifferenz Δn , die sich in **Gleichung 15** aus den Teilchenkonzentrationen des Grundzustands n_0 und des angeregten Zustands n^* ergibt.¹⁹

$$\Delta n = n^* - n_0 \quad (15)$$

Bei positiver Besetzungszahldifferenz ($\Delta n > 0$), überwiegt die Emission, da der angeregte Zustand im Vergleich zum Grundzustand überbesetzt ist. Diese Inversion ist die Voraussetzung für die Verstärkung des Lichtfeldes in diesem invertiertem Medium.¹⁹ Um die Inversion im Laserbetrieb durch Pumpprozesse zu erreichen, reicht ein Zwei-Niveau-System nicht aus. Nicht entartete Niveaus würden einer optischen Sättigung unterliegen, bei der sich maximal gleich viele Teilchen im angeregten, wie im Grundzustand befinden würden. In der Praxis werden häufig Drei- oder Vier-Niveau-Systeme verwendet.¹⁷ **Abbildung 5** zeigt ein Schema über die stattfindenden Prozesse zwischen Anregung und Emission in einem Vier-Niveau-Lasersystem.

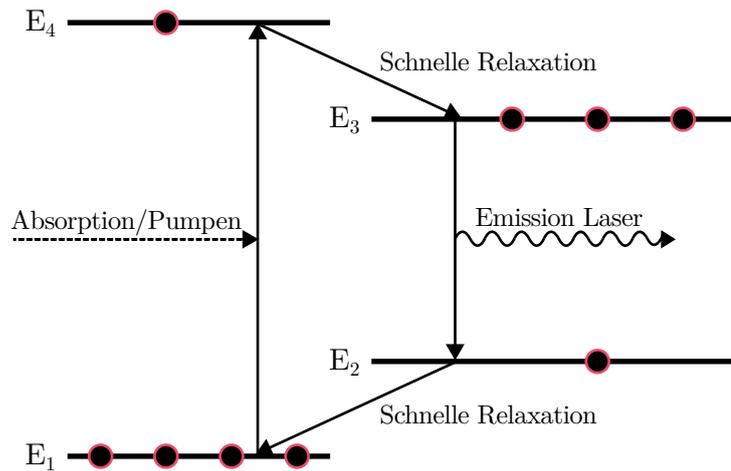


Abbildung 5. Pumpprozess, Inversersion und Emission in einem Vier-Niveau-Lasersystem.¹⁹

Die für die Anregung benötigte Energiezufuhr wird als *Pumpen* bezeichnet und kann durch Absorption von Strahlung, Elektronenstoß oder elektrische Entladung gestaltet werden. Durch das Pumpen gelangt das Lasermedium in den angeregten Zustand E_4 . Von dort aus relaxiert der angeregte Pumpzustand E_4 durch strahlende oder nicht strahlende Prozesse schnell in den oberen Laserzustand E_3 . Die beiden oberen Zustände E_4 und E_3 des Lasersystems in **Abbildung 5** sind grundsätzlich identisch mit einem Drei-Niveau-Lasersystem.¹⁹ Der Übergang zwischen den beiden Laserzuständen E_3 und E_2 findet unter der Emission von Laserstrahlung statt.¹⁹ Die Frequenz ν der emittierten Strahlung ist dabei proportional zum energetischen Abstand der beiden Energieniveaus. Der Inversionszustand kann nur aufrechterhalten werden, wenn die Rate des Relaxationsprozesses von E_2 zu E_1 die Rate des Emissionsprozesses von E_3 zu E_2 übersteigt, das obere Energieniveau also einen Flaschenhals bildet.¹⁹ Das erzeugte Laserlicht ist von hoher Kohärenz, Monochromasie und lässt sich sehr gut bündeln.

Da es kein allgemeines Prinzip für den Bau eines Lasers gibt, gibt es viele Ansätze Emission aus einem invertiertem Medium zu erreichen.¹⁷ Der Helium-Neon-Laser stellt als Gaslaser den bekanntesten Lasertyp dar, da er 1961 als erster cw-Laser (engl. *continuous wave*, Dauerstrichlaser) betrieben wurde.¹⁹ In diesem Gasgemisch wird ein Vier-Niveau-Lasersystem durch die Anregung von Heliumatomen durch Elektronenstoß, Weitergabe der Energie durch Stöße auf Neonatome, Emission durch Neonatome und schließlich Relaxation durch Stöße dieser mit der Außenwand erreicht. Neben weiteren Wellenlängen, wird dieser Laser am häufigsten bei 633 nm genutzt. Gaslaser sind in jedem Fall Festfrequenzlaser, da die Emission immer auf quantisierten, molekularen oder atomaren Übergängen beruht. CO₂-Laser, Argonionenlaser und Excimerlaser zählen zu den technisch bedeutsamen Gaslasern. Der Argonionenlaser ist einer der leistungsstärksten Laser im sichtbaren Wellenlängenbereich, besitzt aber eine geringe Konversionseffizienz und wandelt daher einen großen Teil seiner Eingangsleistung in Wärme um.¹⁹ Im CO₂-Laser werden die Energieniveaus von Schwingungszuständen für eine intensive Emis-

on im infraroten Spektralbereich genutzt. Dadurch gehört dieser Lasertyp zu den leistungsstärksten Lasern überhaupt und wird häufig für die Materialbearbeitung eingesetzt.¹⁷ In Excimerlasern werden im Pulsbetrieb Edelgashalogenide angeregt, welche intensive Pulse im UV-Bereich emittieren und bei der Relaxation dissoziieren. Festkörperlaser sind Laser mit einem festen, optisch aktiven Medium. Sie gewinnen zunehmend an Bedeutung, weil viele Typen mit leistungsfähiger werdenden Diodenlasern angeregt werden können. Eine ökonomische Betriebsweise und eine robuste Bauform machen sie zu häufig verwendeten Lichtquellen. Durch den Einsatz von Dioden als Anregungslichtquelle und eine kompakte Bauweise ist eine Konstruktion von Microchiplasern in kleinen Formaten möglich. Der bekannteste Vertreter der Festkörperlaser ist der Nd:YAG-Laser mit einer Übergangswellenlänge von 1064 nm. Durch Frequenzverdopplung, bzw. Frequenzverdreifung können die Wellenlängen 532 und 355 nm erreicht werden.¹⁷

2.3 LIF-Spektroskopie

Die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) stellt eine hochempfindliche Messmethode für den Nachweis von Atomen und Molekülen dar.²⁰ Die Sensitivität dieser Methode reicht bis hin zur Untersuchung einzelner Makromoleküle unter physiologischen Bedingungen.²¹ Im Gegensatz zu einer möglichen Anregung durch eine Gasentladungslampe oder einer LED erfolgt die Fluoreszenzanregung hier mittels monochromatischer Laserstrahlung. Das Fluoreszenzlicht wird mit CCD-Kameras oder Photomultipliern detektiert, wobei die Intensität Auskünfte über die Konzentration der Spezies geben kann.^{20,22}

2.3.1 Chlorophyll-Fluoreszenz

Der Pflanzenfarbstoff Chlorophyll zeigt durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Spektralbereich Fluoreszenz.²³ Die insgesamt vier Signale werden in zwei Banden blau-grüner Fluoreszenz (BGF) bei 440 und 520 nm und zwei Banden der Chlorophyll-Fluoreszenz (ChlF) bei 685 und 735 nm unterteilt.^{3,24} Die blau-grüne Fluoreszenz wird hauptsächlich durch Ferulasäure in Zellwänden und Blattadern, sowie der Epidermis hervorgerufen. Chlorophyll-Fluoreszenz wird vorwiegend aus der Blattfläche emittiert.³ Grüne Blätter zeigen die Chlorophyll-Fluoreszenz in Form von zwei Banden im Bereich von 685 nm und 735 nm.²⁴ Die sogenannte Chlorophyll-a-Fluoreszenz bei 685 nm wird vorwiegend durch das Photosystem II und dem gebundenem Lichtsammelkomplex hervorgerufen. Das Photosystem I trägt minimal zum Fluoreszenzsignal bei 735 nm bei.^{23,24} Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen beruhen auf drei Effekten der Photonenenergieübertragung: Thermische Dissipation (Wärme), Photochemie und Chlorophyll-Fluoreszenzemission. Falls Anregungen weder in Form von Wärme verloren gehen noch zu Photochemie führen, werden sie als Strahlung in einem als Chlorophyll- α -Fluoreszenz bezeichneten Prozess wieder emittiert.²⁵ Mit steigender Chlorophyll-Fluoreszenz geht daher eine abnehmende Photosynthese und/oder Wärmeabgabe

einher und umgekehrt.²⁶ Kurzfristiger, physiologischer Stress wirkt sich negativ auf den photosynthetischen Elektronentransport in Pflanzenzellen aus und führt zu einer Zunahme des Fluoreszenzverhältnisses 685/735. Langfristiger Stress induziert in Pflanzen einen geringeren Chlorophyll-Gehalt, was ebenfalls zu einer Zunahme dieses Verhältnisses führt.²⁴ Chlorophyll-Fluoreszenz kann zur frühzeitigen Erkennung von biotischem Stress verwendet werden, sogar noch vor dem Auftreten sichtbarer Erkrankungssymptome.²⁷ Als frühes Anzeichen einer Infektion mit falschem Mehltau kann der Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze durch die Einleitung der pflanzlichen Abwehr beeinflusst werden.²⁸ Zusätzlich ist bekannt, dass Pilz-Myzel in befallenem Material im blauen Spektralbereich zur Fluoreszenz angeregt werden kann.²⁹

2.4 Pflanzenmykosen im Weinbau

2.4.1 Falscher Mehltau

Der Eipilz *Plasmopara viticola* (falscher Mehltau) stammt ursprünglich aus Nordamerika und wurde am Ende des 19. Jahrhunderts versehentlich nach Europa eingeschleppt.³⁰ Seit dem richtet er große Schäden im Weinbau an, da sich europäische Sorten in der Abwesenheit dieses Pathogens entwickelten. Der falsche Mehltau gehört zur Familie der *Peronosporaceae*, deren Lebenszyklus eine asexuelle und eine sexuelle Fortpflanzungsphase umfasst. Die asexuelle Phase findet während der Vegetationsperiode statt, während die sexuelle Phase das Überleben des Pathogens im Winter gewährleistet. Der falsche Mehltau verweilt im Winter als Myzel in infizierten Zweigen oder als Oosporen in abgestorbenen Blattläsionen. Im Frühjahr, insbesondere während Regenperioden, keimen die Oosporen und bilden Sporangien, die durch Wasser oder Wind zu den feuchten Blättern in Bodennähe einer Rebe transportiert werden. Diese können dann vom Pilz durch die Spaltöffnungen auf der Blattunterseite infiziert werden. Das Myzel breitet sich dann in den Zellzwischenräumen des Blattes aus, ohne die Zellen direkt zu beschädigen. Es entstehen Sporangiothoren, welche durch die Spaltöffnungen austreten und einen weißen Belag auf der Blattunterseite bilden. Diese können neue Infektionszyklen beginnen.³¹ Falscher Mehltau zeichnet sich im frühen Stadium durch gelbe Verfärbungen der Blätter aus, welche *Ölflecken* genannt werden.¹

2.4.2 Echter Mehltau

Der Schlauchpilz *Erysiphe necator* (Echter Mehltau) entwickelt sich im Frühjahr nach dem Knospenaufbruch, befällt die jungen Blätter und erscheint als weißer Mehltau auf der Blattoberseite.¹ Der Pilz entwickelt Haustorien (Saugorgane), welche die Zellwände auf der oberen Blattschicht durchstoßen und der Pflanze Nährstoffe rauben. Dadurch verwelkt das Blatt und fällt schließlich ab.³² Befallene Beeren werden violett, schrumpfen und trocknen aus.¹

3 Experimenteller Teil

3.1 Aufbau und Charakterisierung des vinoLAS-Labormusters

3.1.1 Konstruktion des vinoLAS-Labordemonstrators

In diesem Abschnitt wird der Aufbau des vinoLAS-Labordemonstrators beschrieben. Der Demonstrator dient zur Anregung und Detektion laserinduzierter Fluoreszenz im Scanverfahren auf Weinblättern. Der Aufbau setzt sich aus drei wesentlichen Modulen zusammen: Die zur Fluoreszenzanregung benötigten Lasermodule 1 und 2, sowie dem Scan- und Detektionsmodul. Als Basis dient in jedem Modul jeweils ein Breadboard (30 x 45 cm, MSB3045/M, Thorlabs) zur Montage der Komponenten (**Abbildung 6**). Beide Lasermodule sind mit einem Microchiplaser (Microchip Laser P4-236/355, Bright Solutions) ausgestattet. Bei den Microchiplasern handelt es sich um Nd:YAG-Festkörperlaser, die bei einer Wellenlänge von 1064 nm sowie der frequenzverdoppelten sowie -verdreifachten Wellenlänge von 532 nm bzw. 355 nm mit Pulsen von 0.34 J bei einer Repetitionsfrequenz von 5 kHz emittiert, sowie einem zweiten Nd:YAG Lasermodul. Hierbei wird der Übergang bei 946 nm genutzt und zu 473 nm frequenzverdoppelt bzw. zu 236 nm vervierfacht. Die Lasermodule und die dazugehörigen Stromversorgungsmodule wurden auf den Breadboards mit Posts in jeweils einer Ecke installiert. Die passiven Kühlkörper beider Laser wurden entfernt und mit aktiven Axiallüftern (5 cm) versehen. Diese wurden mit Hilfe einer Spannungsreglung (hauseigene Konstruktion) über das 15 V-Netzteil der Laser mit einer Spannung von 12 V versorgt. **Abbildung 6** zeigt als Übersicht ein Foto der beiden Lasermodule 1 und 2 auf einem optischen Tisch.

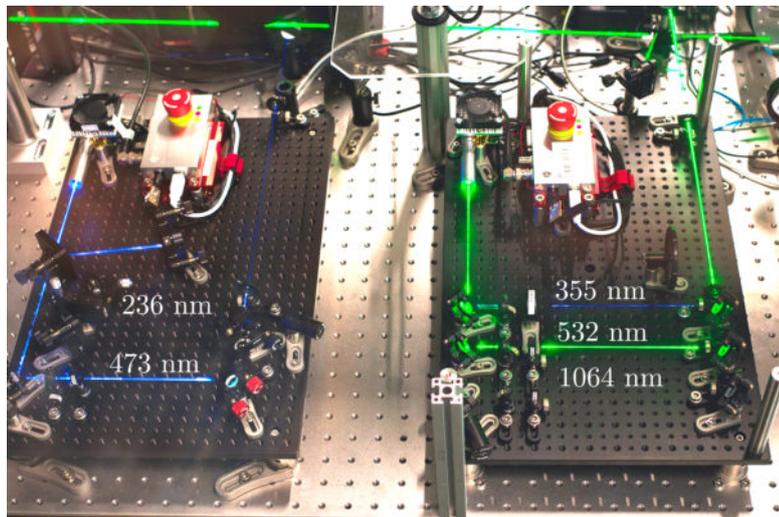


Abbildung 6. Lasermodule 2 und 1 (v.l.) als Laboraufbau auf einem optischen Tisch, zum Zeitpunkt der Auskopplung der Anregungstrahlen, vor dem Zusammenbau des Demonstrators. Oben links auf beiden Modulen: Nd:YAG-Microchiplaser mit Treibermodul. Jeweils auf der linken Seite des Breadboards befindet sich die Wellenlängenseparation und rechts die Zusammenführung zum Anregungstrahl. Die Wellenlängen 236 und 1064 nm befinden sich außerhalb des sichtbaren Bereichs.

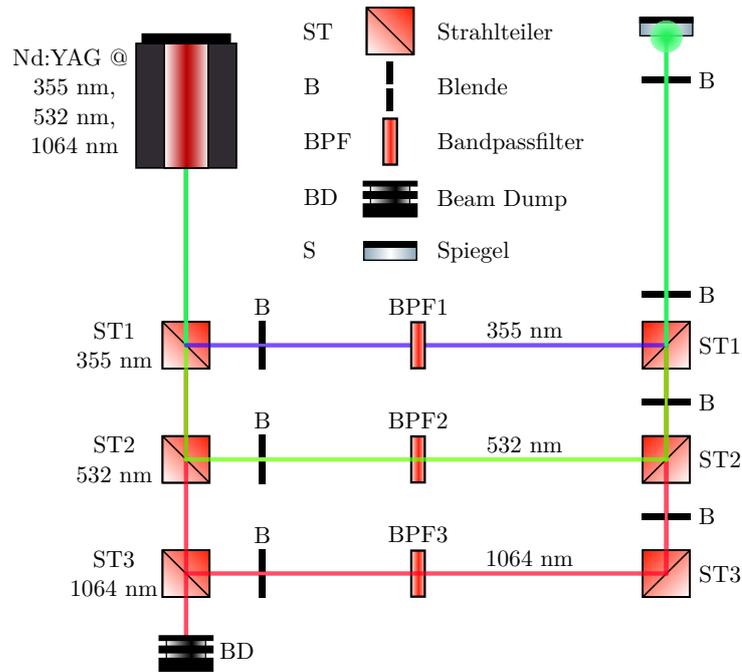


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Lasermoduls 1, bestehend aus den Anregungswellenlängen 355, 532 und 1064 nm. Ausgehend vom Nd:YAG-Microchiplaser (oben links) findet eine Wellenlängenseparation zur Selektion der Anregungswellenlänge und eine anschließende Zusammenführung zum Anregungsstrahl statt. Dieser wird oben rechts durch einen Spiegel vertikal zum Scan- und Detektionsmodul umgeleitet.

Lasermodul 1 (355, 532 und 1064 nm): Im finalen Aufbau des Demonstrators wurde das Lasermodul 2 auf dem Lasermodul 1 montiert und das Scan- und Detektionsmodul als oberstes wiederum auf diesem (**Abbildung 10 (b)**). Ein Überblick über den Aufbau und die Komponenten des Lasermoduls 1 liefert die Skizze in **Abbildung 7**. Der Microchiplaser des Lasermoduls 1 emittiert bei den Wellenlängen 355, 532 und 1064 nm. Die Strahlen der unterschiedlichen Wellenlängen liegen bei einer Strahlhöhe von 33.5 mm zum Breadboard parallel aufeinander. Zur Miniaturisierung wurden die meisten optischen Komponenten im 1/2-Zoll-Format, sowie Optikhalterungen der Firmen Thorlabs und Edmund Optics verwendet. Zur Wellenlängenseparation wurden die einzelnen Wellenlängen jeweils mit einem harmonischen Strahlteiler (ST1-3, HBSY053, HBSY052, HBSY051, Thorlabs) in einem Winkel von 90° zum Hauptstrahl des Lasers in aufsteigender Reihenfolge der Wellenlänge getrennt. Der restliche Anteil, der durch alle Strahlteiler propagiert, wird in einen Beam Dump (BD) geleitet. Durch den Einsatz von Blenden (B, ID8/M, Thorlabs) hinter den Strahlteilern (ST1-3) wurden zusätzlich reflektierte Strahlen nicht gewünschter Wellenlängen sowie Streulicht abgeschattet. Die Monochromasie der separierten Laserstrahlen wurde durch die Transmission durch Bandpassfilter (BPF1-3) erhöht. Zwischen den Bandpassfiltern und den folgenden Strahlteilern wurde im Aufbau ein bewusster Abstand eingehalten, um eine Wellenlängenselektion bei der Nutzung des Aufbaus durch das Blockieren einzelner Strahlen zu

ermöglichen. Durch den Einsatz der gleichen dichroitischen Strahlteiler (ST1-3) für jede Wellenlänge wurden die einzelnen Strahlen wieder kollinear zu einem Hauptstrahl überlagert. Die Justage der Strahlteiler und Führung des Strahls im *Beam Walk* durch mehrere Blenden ermöglichte eine Parallelisierung. Die Ausrichtung wurde nach Auskopplung des Strahls aus dem Aufbau mit Hilfe eines Leistungsmessgeräts mit Photodioden-Detektionskopf soweit optimiert, dass die Strahlen nach der Überlagerung über eine Distanz von mindestens 2.6 m vollständig kollinear verlaufen. Die vier Blenden auf der Seite der Strahlzusammenführung wurden im Vorfeld bei minimalster Blendenöffnung mit einem Justierlaser auf Strahlhöhe auf gleiche eine gleiche Höhe und horizontale Ausrichtung eingestellt. Für die finale Zusammenführung aller Module wurde der zusammengefügte Strahl im 90°-Winkel durch einen 45° vertikal geneigtem Laserline-Spiegel (S, 11-613, Edmund Optics) nach oben zum Scan- und Detektionsmodul abgelenkt.

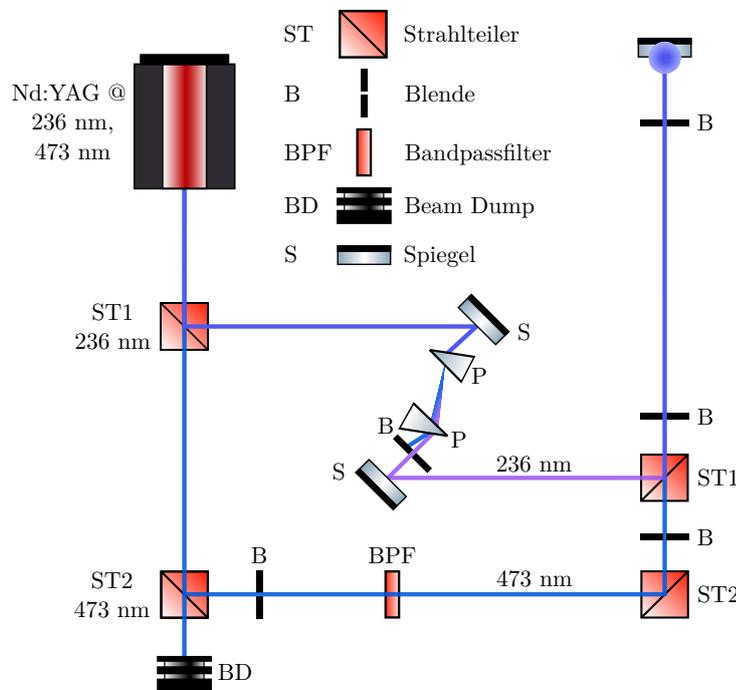


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Lasermoduls 2, bestehend aus den Anregungswellenlängen 236 und 473 nm. Ausgehend vom Nd:YAG-Microchiplaser (oben links) findet eine Wellenlängenseparation zur Selektion der Anregungswellenlänge und eine anschließende Zusammenführung zum Anregungsstrahl statt. Dieser wird oben rechts durch einen Spiegel vertikal zum Scan- und Detektionsmodul umgelenkt.

Lasermodul 2 (236 und 473 nm) Die Komponenten des Aufbaus des Lasermoduls 2 sind in der Skizze in **Abbildung 8** dargestellt. Der Microchiplaser dieses Lasermoduls emittiert bei den Wellenlängen 236 und 473 nm. Nach dem Einbau des Lasers betrug die Strahlhöhe 32.7 mm zum Breadboard. Die Wellenlänge 236 nm wurde durch einen Strahlteiler (ST1, F38-266SG, AHF Analysentechnik) separiert und durch einen Aluminiumspiegel (S, PF10-03-F01, Thorlabs) auf ein Prisma (S,

CaF₂, PS862, Thorlabs) auf einem Rotationstisch umgeleitet. Durch die Dispersion im Prisma wurden die Wellenlänge 236 nm von restlichen Laserlicht von 473 nm getrennt. Durch den Einsatz eines einstellbaren Spaltes (B) konnte in Kombination mit der Rotation des Prismas der Strahl mit 473 nm abgeschattet und der Strahl mit 236 nm durch den Spalt transmittiert werden. Durch einen weiteren Aluminiumspiegel (S, PF10-03-F01) wurde der 236 nm-Strahl auf einen Strahlteiler (ST1) derselben Art wie zur Separation vom Ausgangsstrahl gelenkt. Die Separation der Wellenlänge 473 nm vom Hauptstrahl erfolgte durch die Verwendung eines weiteren Strahlenteilers (ST2, F38-596, AHF Analystechnik) in einem 90°-Winkel. Nicht reflektierte Strahlung wurde hinter diesem durch einen Beam Dump (BD) aufgefangen. Durch den Einsatz einer Blende (B, ID8/M, Thorlabs) und eines Bandpassfilters (BPF, 34-502, Edmund Optics) wurde die Monochromasie des separierten 473 nm-Strahls erhöht und dieser anschließend auf einen zur Separation gleichen dichroitischen Strahlteiler (ST2) gelenkt. Die Strahlen beider Wellenlängen wurden analog zum Lasermodul 1 durch zuvor justierte Blenden (B) gelenkt und zu einem Hauptstrahl zusammengefügt. Die Leistungsoptimierung durch Justage, sowie die Parallelisierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines Leistungsmessgeräts nach Auskopplung auf einer Entfernung von 2.10 m. Der zusammengeführte Hauptstrahl dieses Lasermoduls wurden für den finalen Zusammenbau des Demonstrators ebenfalls durch die Verwendung von zwei Aluminiumspiegel (S, PF05-03-F01, Thorlabs) im 90°-Winkel nach oben geführt.

Scan- und Detektionsmodul: Eine Übersicht des Scan- und Detektionsmoduls zeigt **Abbildung 9** ein Foto dieses Moduls befindet sich in **Abbildung 10 (a)**. Zur Fluoreszenzanregung werden die beiden Strahlen der Lasermodule 1 und 2 genutzt. Diese wurden zuvor durch Spiegel im 90°-Winkel vertikal reflektiert. Die Strahlen wurden mit Hilfe der beschriebenen Spiegel durch Löcher des Gewindelochrasters des Breadboards nach oben justiert um das Scan- und Detektionsmodul zu erreichen. Die vertikalen Strahlen wurden durch 45° geneigte Spiegel (S1: 11-613, Edmund Optics, S2: PF05-03-F01, Thorlabs) horizontal zueinander auf die Spitze eines 90°-Prisma (MRAK25-G01, Thorlabs) justiert, dessen Katheten Aluminiumbeschichtet sind. Durch die Ausrichtung auf die rechtwinklige Kante von beiden Seiten resultierte durch Reflexion orthogonal zur Prisma-Hypotenuse ein Anregungsstrahl, bei dem sich die Strahlen aller Wellenlängen beider Lasermodule nahezu überlagern. Der Anregungsstrahl wurde über die beiden Aluminiumspiegel S3 (PF10-03-F01, Thorlabs) und S4 (PF05-03-F01, Thorlabs) auf einen Scanspiegel (elliptischer Spiegel) justiert. Um den Strahl mittig auf den Scanspiegel zu justieren, wurde eine Ellipsenförmige Papierschablone verwendet. Der Scanspiegel ist über eine Halterung auf dem 3D-Druck mit einer kugelgelagerten Achse verbunden, welche von einem Schrittmotor über einen Zahnriemen (**Abbildung 10 (a)**) angetrieben wird. Der Schrittmotor wird von einem Treiber (MCU) betrieben, welcher gleichzeitig mit

wellenlängen 355, 473 und 532 nm (87-015, Edmund Optics; 14-752, Edmund Optics; NF533-17, Thorlabs). Hinter den Notchfiltern befindet sich eine Einkopplung, bei der das Fluoreszenzlicht im Brennpunkt der Sammellinse in einen Y-Lichtwellenleiter (Multimode, 200 μm Kerndurchmesser, 1 m Länge, 727-733-2447, Ocean Insight) eingekoppelt wird. Der Lichtwellenleiter dient zur Verteilung der empfangenen Fluoreszenzintensität auf die Detektionssysteme. Zur Detektion werden ein Spektrometer (Maya 2000 Pro, Ocean Insight) und ein 4-Kanaldetektor verwendet. Der 4-Kanaldetektor setzt sich aus einem optischen Cage-System und einer Integratorschaltung (hauseigene Entwicklung) zusammen. Vor dem Erreichen des Lichts am Cage-System wurden die Pulse des Fluoreszenzlichts durch einen weiteren Lichtwellenleiter (Multimode, 600 μm Kerndurchmesser, 5 m Länge, M29L05, Thorlabs) um 16.68 ns verzögert, um die Funktion der Integratorschaltung zu gewährleisten. Im Cage-System des 4-Kanaldetektors wird das Fluoreszenzlicht nach dem Fokussieren durch eine Linse (20 mm Brennweite, LA1074-AB, Thorlabs) durch mehrere Strahlteiler und Bandpassfilter auf die Wellenlängen 450, 527, 676 und 735 nm aufgeteilt, um die vier Kanäle der BGF und ChlF abzudecken. Mit Hilfe von Linsen (20 mm Brennweite, LA1074-AB, Thorlabs) wird das Licht jeden Kanals auf jeweils eine Avalanche-Photodiode (APD, APD410A2/M, Thorlabs) fokussiert. Die Photodioden senden ein intensitätsabhängiges, analoges Spannungssignal an die Integratorschaltung. Dieses analoge Signal wird in der Integratorschaltung von einem Analog-Digital-Wandler in ein digitales Signal umgewandelt. Durch die Taktgebung des Output-Triggersignals des Lasers des Lasermoduls 1 wandelt der Integrator die Intensitätsinformation in ganzzahlige Counts pro definiertem Zeitfenster um. Diese werden in der Integratorschaltung von einem Mikrocontroller verarbeitet und für jeden der vier Kanäle mit einem Zeitstempel seriell ausgegeben.

Für den finalen Demonstrator-Aufbau wurden alle Module aufeinander auf einem Fotostativ mitsamt Versorgungselektronik und Kabelage montiert (**Abbildung 10(b)**). Alle USB-Verbindungen wurden mit einem USB-Hub, sowie Netzstecker mit Mehrfachsteckdosen gebündelt. Ein Gehäuse für die Elektronik, sowie eine X-förmige Halterung zwischen Stativ und Breadboard wurde im 3D-Druck-Verfahren gefertigt (Design: Autodesk Inventor, Druck: Fused Deposition Modeling, PLA, S5, Ultimaker).

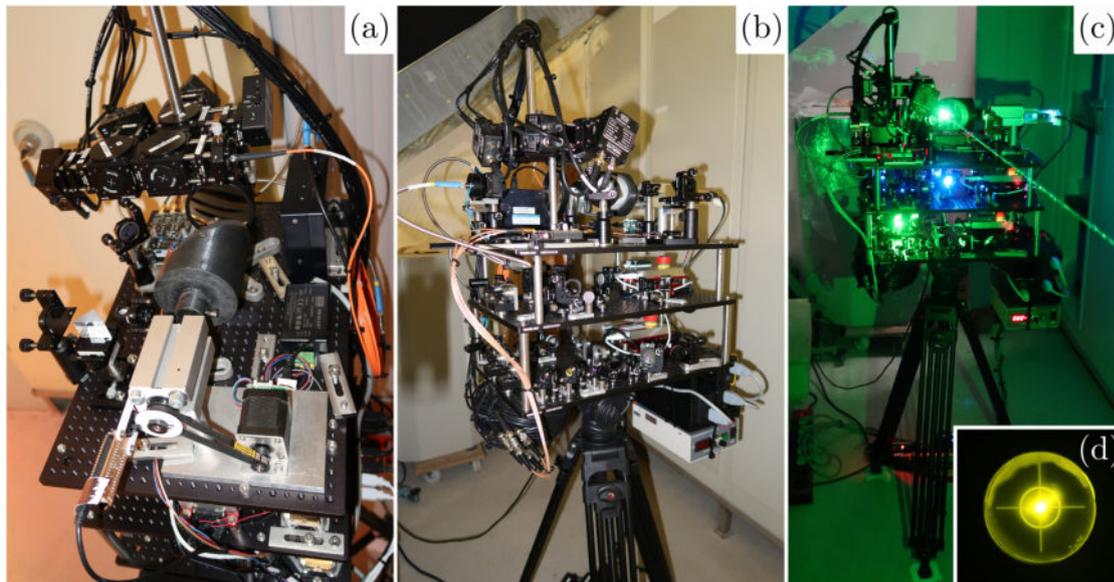


Abbildung 10. (a): Scan- und Detektionsmodul in der Draufsicht. (b): Final montierter Labordemonstrator auf Fotostativ, bestehend aus Versorgungselektronik, Lasermodul 1 und 2, Scan- und Detektionsmodul und 4-Kanal Detektor (v.u.). (c): Labordemonstrator in Betrieb, bei allen aktiven Anregungswellenlängen. (d): Laserspot des Anregungsstrahls aller Wellenlängen auf Fluoreszenztarget zur Kalibrierung des Scanspiegels.

Softwarearchitektur: Für die Ansteuerung des Demonstrators wurde ein Python-Skript geschrieben, welches sich verschiedener Gerätetreiber bediente und elementare Messfunktionen zur Verfügung stellt. Die Treiber für die Integratorschaltung und für die Bedienung des Schrittmotors für den Scanspiegel entstammen der hauseigenen Entwicklung. Die Ansteuerung der beiden Microchiplaser erfolgte durch die Kommunikation mit diesen mittels serieller Codes, zusammengefasst zu einer Treiberklasse. Für das Auslesen des Spektrometers wurde die Seabreeze API des Herstellers Ocean Insight verwendet. Das Skript zur Ansteuerung des Demonstrators umfasst Funktionen zur Ansteuerung der einzelnen Gerätekomponenten, wie dem Auslesen der Detektoren, Steuerung der Laser, oder Bewegung des Scanspiegels, sowie verschiedene Messmodi (Scanmessung, Punktmessung), welche die Hardwarefunktionen vereinen, als auch Funktionen zur Kalibrierung und für Referenzmessungen. Außerdem diente das Python-Skript der Terminalgeführten Durchführung der Messroutine innerhalb der Messkampagne, bei der durch alle aktiven Proben einer SQL-Datenbank iteriert wurde und ebenfalls Parameter wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Fotos abgefragt wurden. Die gleichzeitige Bewegung des Scanspiegels und die Aufnahme der Daten von Spektrometer und 4-Kanaldetektor wurde durch Threading erreicht. Für jede Messung lieferte die Skript während der Messroutine Vorschauplots zur Überprüfung der aktuell aufgenommenen Daten.

3.2 Charakterisierung des Lasersystems

3.2.1 Leistungsmessungen

Alle Leistungsmessungen fanden mit einem Powermeter (PM100D, Thorlabs) mit einem UV-erweitertem Si-Photodiodenmesskopf (S120VC, Thorlabs) im CW-Modus statt. Das Powermeter verwendete die werksseitige Kalibrierung. Von dieser wurde durch das Einstellen der zu messenden Wellenlänge zu jeder Messung Gebrauch gemacht. Vor jeder Messung wurde das Gerät außerdem auf das Umgebungslicht referenziert. Die Gesamtleistungen der überlagerten Wellenlängen beider Microchiplaser, sowie Leistungen der separierten Wellenlängen hinter den Bandpassfiltern, bzw. vor der Strahlzusammenführung wurden während des Aufbaus der Lasermodule gemessen. Außerdem wurde die Leistungen aller zur Messung verwendeten Wellenlängen am Messpunkt zu Beginn und zum Ende der Messkampagne bestimmt.

3.2.2 Spektrale Betrachtungen

Für die Messungen der Spektren der Anregungslaser wurde ein Spektrometer (Maya 2000 Pro, Ocean Insight) verwendet. Die Präsenz der Laserwellenlängen wurde während des Aufbaus nach dem Auskoppeln der Anregungslaser bei einer Distanz von 2.60 m (Lasermodul 1) und 2.10 m (Lasermodul 2) ausgehend von der letzten Blende des optischen Ausbaus bestimmt. Dabei wurde die Reflexion der Strahlung an einem weißen Papierstreifen mit dem Spektrometer gemessen. Außerdem wurden Spektren der für die Messungen verwendeten Anregungswellenlängen während der Messkampagne am Messpunkt aufgenommen. Dabei wurde die Reflexion der Strahlung von mattschwarzem Lack gemessen.

3.2.3 Bestimmung von Strahlprofilen

Zur Bestimmung der Strahlprofile wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet. Während des Aufbaus der Lasermodule wurden die Strahlprofile mit der Knife-Edge Methode nach der Separation der einzelnen Wellenlängen hinter den Bandpassfiltern bestimmt. Weiterhin wurden die Strahlprofile des finalen Demonstrators während der Messkampagne am Messpunkt mit Hilfe einer Beam Profiling Kamera untersucht.

Knife-Edge Messungen: Zur Durchführung der Knife-Edge Messungen wurde eine Cuttermesser-Klinge mit einer Halterung aus dem 3D-Druck auf einem linearen Verschiebetisch orthogonal zur Laserrichtung montiert. Hinter der Klinge wurden Leistungsmessungen der Laserstrahlung mit dem bereits beschriebenen Powermeter durchgeführt. Zu Beginn der Messungen wurden die Strahlprofile vollständig durch die Klinge abgeschattet. Zur Profilmessung jeder Wellenlänge wurde dann die Klinge über 80 Datenpunkte mit Hilfe des Verschiebetisches um 5 μm pro Datenpunkt verstellt und die Leistung der nicht-abgeschatteten Strahlung gemessen.

Bestimmung mittels Beam Profiling Kamera: Während der Messkampagne wurden die Strahlprofile der Anregungslaser aller Wellenlängen mittels einer Beam Profiling CMOS-Kamera (WinCamD LCM-C-UV, DataRay) am Messpunkt bestimmt.

3.2.4 Untersuchung der Laserpulse am Oszilloskop

Während des Aufbaus der Lasermodule wurden mit Hilfe eines Oszilloskops (DSO7104B, Agilent Technologies) das Output-Trigger Signal des Lasers des Lasersmodul 1, als auch die Laserpulse an Photodioden (DET102A, Thorlabs; ET-4000, EOT) untersucht. Die Photodioden wurden dabei in den ausgekoppelten Anregungsstrahl des Lasermoduls, hinter der letzten Blende des optischen Aufbaus justiert. Es wurden Frequenz und Pulsbreite, sowie der Jitter des Triggersignals und des Laserpulses an der Photodiode gemessen

3.3 Durchführung der Messkampagne

3.3.1 Probenmanagement der Topfreben

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Wein-Topfreben der Sorte Riesling durchgeführt. 30 Topfreben dieser Sorte wurden am 08.08.2022 aus dem Institut für Phytomedizin im Wein- und Gartenbau der Hochschule Geisenheim beschafft. Die Topfreben (i.F. Proben) wurden in gesunde Kontrollgruppe (zehn Reben), inokulierte Gruppe (zehn Reben) und eine Gruppe unbekannter Gesundheitszustände (zehn Reben) aufgeteilt. Bei den Unbekannten fand bei der Hälfte der Proben eine Inokulation statt, jedoch waren der experimentierenden Person die Zustände nicht bekannt. Nach Erhalt der Proben wurden diese auf eine einheitliche Länge gekürzt und junge Triebe abgeschnitten. Die Proben wurden zwei Tage vor der Inokulation, am Tag der Inokulation, sowie drei, sieben und elf Tage nach der Inokulation händisch bewässert. Dabei wurde jede Topfrebe für drei Sekunden mit einem zuvor eingestellten Volumenstrom an Trinkwasser bewässert, welcher über die gesamte Messkampagne konstant gehalten wurde. Jeweils eine Probe aus der Kontrollgruppe und aus der inokulierten Gruppe wurden während der Messkampagne nicht mit Wasser versorgt. Eine reproduzierbare Beleuchtung der Topfreben wurde durch eine Zeitschaltuhr gewährleistet. Dabei wurden die Reben täglich von 22 bis 6 Uhr mit Pflanzenlampen (PAR38 LED, Megaman) beleuchtet und während der Messungen am Tag im dunkeln gehalten. Befall von echtem Mehltau (*Erysiphe necator*) wurde mit feuchten Tüchern von der Blattoberseite gewischt. Um die Topfreben während der Handhabung im Laboralltag eindeutig unterscheiden zu können und die Identifizierung zu vereinfachen, wurde in dieser Arbeit ein Probenmanagement-System verwendet. Als Grundlage dieses Systems dient ein selbst entwickeltes Python-Skript, das alle Proben in einer SQL-Datenbank verwaltet. In dieser Datenbank sind die einzelnen Proben mit einem Namen (z.B. *Larissa*) hinterlegt. Zu diesem Namenseintrag enthält die Probendatenbank In-

formationen über die Rebensorte, eine laufende Probennummer, Herkunft und Erhaltungsdatum, sowie Gesundheitszustand bei Erhalt der Rebe. Für jede Weinrebe wurde bei Erhalt ein neuer Datenbankeintrag angelegt, welcher sich in Form eines Interviews durch das Python-Skript gestaltete. Das Skript erstellte schlussendlich ein Label für jede Probe, welches neben dem Namen der Probe einen QR-Code enthält, mit dem bei Bedarf die genannten Probeninformationen aus der Datenbank abgerufen werden konnten. Dadurch konnte einerseits ein einfacher Umgang mit den Proben, als auch eine schnelle und vollständige Verfügbarkeit der Probeninformationen gewährleistet werden.

3.3.2 Inokulation

Zur Inokulation der Topfreben wurde eine Suspension aus Sporangien des falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) in demineralisiertem Wasser (Arium Mini, Sartorius) hergestellt. Für die Gewinnung der Sporangien wurden bereits befallene Blätter in einem Becherglas fixiert und die Blattunterseite mit einem Nebel aus demineralisiertem Wasser besprüht. Durch das Abspülen von 20 Blättern wurde unter ständigem Rühren eine farblose Suspension unbekannter Sporangienkonzentration erhalten. Die Suspension wurde filtriert und mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur für 5 min homogenisiert. Die Konzentration der Suspension wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops in einer Thoma-Auszählkammer dreifach bestimmt. Mit demineralisiertem Wasser wurde die Suspension auf 4×10^5 Sporangien/mL verdünnt. Die zu inokulierenden Proben wurden mit der Sporangien suspension und die Kontrollgruppe mit demineralisiertem Wasser auf der Blattunterseite eingesprüht. Alle Reben wurden für 17 Stunden in zuvor befeuchtete Müllsäcke eingetütet. Der Tag der Inokulation wird als 0 dpi (days post inoculation) gezählt. Sieben Tage nach Inokulation (7 dpi) wurden die Topfreben nach der Messroutine an den Blattunterseiten mit demineralisiertem Wasser besprüht und erneut über Nacht in befeuchteten Mülltüten eingehüllt.

3.3.3 Probendokumentation

Neben LIF-Messungen wurden in der Messkampagne täglich die Temperatur und Luftfeuchtigkeit des Raums, in dem die Topfreben aufbewahrt und vermessen wurden, festgehalten. Vor jeder Messung wurden vier Fotos jeder Topfrebe angefertigt. Dabei wurden die Reben von oben und unten aufgenommen, als auch Nahaufnahmen der zu messenden Blätter von der Blattober- und Unterseite gemacht. Weiterhin wurde der aktuelle optische Zustand jeder Rebe vor jeder Messung notiert.

3.3.4 Messvorbereitung

Nach Erhalt der Topfreben wurde ein zu messendes Blatt jeder Rebe mit Hilfe eines DVD-Markers mit zwei Strichen (jeweils ca. 1 cm) im Abstand von 5.5 cm übereinander versehen, welche den Scanbereich im Messpunkt des Aufbaus markie-

ren (**Abbildung 11 (b)**). Die Topfreben wurden zur Messung auf einer Plattform auf einem zweitem Fotostativ positioniert (**Abbildung 11 (a)**). Mit einem in schwarzen Schaumstoff eingelassenen Magneten wurde jeweils das markierte Blatt auf einer mattschwarzen Stahlplatte (Messplatte) mit der Blattoberseite zum Anregungsstrahl fixiert und mit seinen Messmarkierungen an zwei weiteren Markierungen auf der Stahlplatte ausgerichtet (**Abbildung 11 (c)**). Dabei wurde darauf geachtet, dass der Strahlungsweg der Anregungslaser nicht durch weitere Blätter blockiert wird und zu messende Blätter keinen physischen Schaden nehmen.

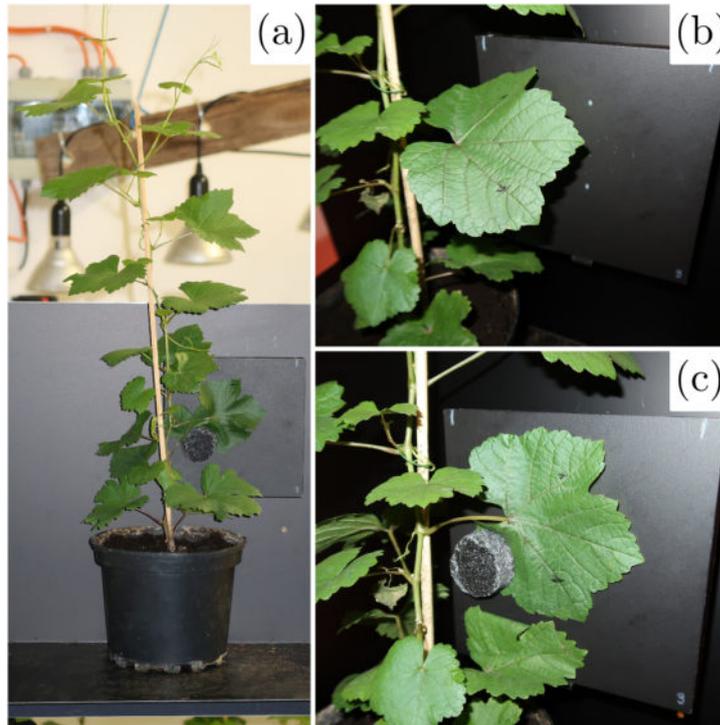


Abbildung 11. (a): Riesling-Topfrebe auf Messplattform vor einer Messung. (b): Zu messendes Blatt mit Messmarkierungen (Scanbereich) vor Messplatte mit Ausrichtungsmarkierungen (Messpunkt). (c): Fixiertes Blatt auf Messplatte, die Messmarkierungen liegen auf den Ausrichtungsmarkierungen.

3.3.5 Ablauf der Messroutine

Die Messroutine fand täglich in der Zeit von 9 bis 17 Uhr statt und wurde durch mit Hilfe der geführten, terminalbasierten Routine des Python-Messskripts durchgeführt. Zu Beginn des Tages wurden die Initialien der experimentierenden Person, die Raumtemperatur und die Luftfeuchtigkeit erfasst. Diese Informationen wurden in einer .txt-Datei im Probenordner des jeweiligen Tages der vom Skript automatisiert erstellten Ordnerstruktur hinterlegt. Die Anregungslaser wurden aktiviert und der Scanspiegel durch das Ausrichten des Anregungsstrahls auf ein Fluoreszenztarget in Höhe der oberen Messmarkierung einmalig zu Beginn jedes Messtages kalibriert. Zur Intensitätsnormierung fand eine LIF-Scanmessung über die Standard-Scandistanz von 5.5 cm im Messpunkt auf dem Fluoreszenztarget

statt. Nach dem täglichen Kalibrierungs- und Normierungsprozess wurden LIF-Messungen aller Topfreben bei den Anregungswellenlängen 355, 473, 532 nm sowie Reflexionsmessungen bei 1064 nm und kombinierte Messungen bei allen Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355, 532, und 1064 nm) in derselben Abfolge durchgeführt. Die Wellenlängenseparation erfolgte durch das Platzieren von Detektionskarten im optischen Aufbau hinter den Bandpassfiltern der Lasermodule. So wurden beispielsweise für eine LIF-Messung bei 532 nm die Strahlen der Wellenlängen 355 und 1064 nm mit der Detektionskarte blockiert und der Laser des Lasermoduls 1 über den seriellen Treiber aktiviert. Da die Wellenlänge 236 nm des Lasermoduls 2 nicht bis zum Messpunkt transportiert werden konnte, wurde diese im optischen Aufbau für die Messkampagne permanent blockiert.

Die Messungen erfolgten als Scan-Messungen, bei denen der Anregungslaser das zu messende Blatt zwischen den Messmarkierungen im Scanbereich von 5.5 cm für jeweils 20 s abgefahren hat. Während dieser Anregungszeit erfolgte gleichzeitig die Detektion mittels Spektrometer und 4-Kanal Detektor. Dabei wurden vom Spektrometer 140 Einzelspektren mit einer Integrationszeit von jeweils 80 ms aufgenommen und ein gemittelttes Spektrum gespeichert. Der 4-Kanaldetektor nahm in dieser Zeit 1×10^5 Integrationspunkte pro APD auf. Vor jeder Messung fand bei gleichen Parametern eine Referenzmessung statt, wobei eine mattschwarze Stahlplatte als Referenzmuster vor das Weinblatt positioniert wurde. Dieser Ablauf wurde an einem Messtag für jede der 20 Proben aus der inokulierten Gruppe und Kontrollgruppe bei jeder der fünf Wellenlängeneinstellungen wiederholt. Vor der Inokulation wurden alle Proben (Unbekannte ausgenommen) an vier Tagen im gesunden Zustand gemessen. Die Messungen an den unbekannt Proben fanden bei 2, 9 und 14 dpi statt.

3.4 Detektion von *Plasmopara viticola* am Beispiel eines Riesling-Blatts

Jeweils ein Blatt einer stark befallen und gesunden Topfrebe wurde mit Hilfe des Labordemonstrators gemessen. Die LIF-Messungen fanden im Scan-Modus bei zur Messroutine analogen Parametern statt. Die Blattproben stammten von Topfreben aus der unbekannt Gruppe.

3.5 Statistische Messungen zur Validierung der Methodik

3.5.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen des Mehлтаubefalls

Der Befall der Riesling-Blätter mit *Plasmopara viticola* wurde mit Hilfe eines USB-Lichtmikroskops (Hersteller: dnt) untersucht. Dabei wurden Nahaufnahmen und Übersichtsaufnahmen von der Blattober- und Unterseite eines befallenen und eines gesunden Blatts gemacht.

3.5.2 Aufnahmen des Mehлтаubefalls mit dem Rasterelektronenmikroskop

Mit einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-IT200, Jeol) wurden Aufnahmen eines gesunden und eines mit *Plasmopara viticola* befallenen Blatts gemacht. Dafür wurden repräsentative Stellen beider Blätter ausgeschnitten und mit Carbon-Klebeband auf einem Probenhalter fixiert. Nach dem Einsetzen des Probenhalters in das Mikroskop wurde dieses evakuiert (0.3 mbar). Bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV wurden Daten bei den Vergrößerungsfaktoren 50, 500 und 1300 von Stomata, Hyphen und Sporangienträgern des *Plasmopara viticola* aufgenommen.

3.5.3 Fluoreszenzmessungen der Blattunterseite

Ein Blatt ohne Befall und ein Blatt mit deutlich sichtbarem Befall von *Plasmopara viticola* aus der unbekannt Gruppe wurden LIF-Messungen am Labordemonstrator bei den Anregungswellenlängen 355, 473, 532 nm sowie Reflexionsmessungen bei 1064 nm und kombinierte Messungen bei allen Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355, 532, und 1064 nm) unterzogen. Dabei wurden Scan-Messungen auf der Blattunter- und Blattoberseite durchgeführt.

3.5.4 Anregungsemissionsspektren der Sporangiensuspension im Fluoreszenzspektrometer

Die zur Inokulation verwendete Sporangiensuspension (2 mL) wurde in eine Quarzglas-Küvette überführt. In einem Fluoreszenzspektrometer (Spectrofluorometer FS5, Edinburgh Instruments) wurden Anregungsemissionsspektren dieser Suspension aufgenommen. Die Anregung fand dabei von 200 bis 550 nm in 2 nm-Schritten statt. Die Emission wurde im Bereich von 210 bis 820 nm in 2 nm-Schritten und einem Offset von 10 nm gemessen. Es wurden drei Spektren von einer Integrationszeit von jeweils 1 s pro Schritt für eine Mittelwertbildung herangezogen.

3.5.5 LIF-Messung der Sporangiensuspension am vinoLAS-Labormuster

Die Sporangiensuspension, welche für die Inokulation der Topfreben verwendet wurde, wurde analog zu **Unterunterabschnitt 3.5.4** in eine Quarzglasküvette überführt. Im Modus der Punktmessung (Keine Bewegung des Scanspiegels) wurden eine LIF-Messung der Suspension am Labordemonstrator bei einer Wellenlänge von 355 nm und einer Anregungs- und Detektionszeit von 20 s durchgeführt.

3.5.6 Fluoreszenzunterschiede auf einem einzelnen Blatt

Ein Weinblatt ohne sichtbaren Befall einer Topfrebe aus der unbekannt Gruppe wurde auf einem linearen Verschiebetisch (VT-80 25 2SM, PI) fixiert. Der Verschiebetisch wurde mit Hilfe von Optomechanik im Scanbereich des Messpunktes

positioniert. Bei gleichen Parametern zur Messroutine wurden Scanmessungen der Blattoberseite bei allen Wellenlängen des Aufbaus durchgeführt. Dabei wurde der Verschiebetisch nach jeder Scanmessung weiter bewegt und so das Blatt eindimensional abgerastert.

3.5.7 Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz auf Weinblättern

Ein Weinblatt ohne sichtbaren Befall einer Topfrebe aus der unbekanntenen Gruppe wurde auf einem Träger fixiert, welcher sich auf einem vertikal montiertem Rotationstisch im Scanbereich des Messpunktes befand. Bei der Anregungswellenlänge von 355 nm und der Kombination aller Wellenlängen des Lasermoduls 1 wurden LIF-Punktmessungen auf der Mitte der Oberseite des fixierten Blatts durchgeführt. Nach jeder Punktmessung wurde der Winkel des Blatt verändert. Im Bereich von 0 bis 10° wurde der Winkel dabei in 2°-Schritten und ab 10 bis 60° in 10°-Schritten geändert.

3.5.8 Fluoreszenzverhalten bei wiederholter Anregung

Bei der Kombination aller Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355, 532 und 1064 nm) wurden zehn LIF-Punktmessungen an derselben Stelle nacheinander durchgeführt. Zwischen den Messungen wurde eine Karenzzeit von 90 s eingehalten.

3.5.9 Bestimmung des Einflusses von Messmarkierungen auf der Blattoberfläche

Abschattung des Blatts durch Messmarkierungen In diesem Versuch wurde ein Weinblatt einer gesunden Topfrebe aus der Kontrollgruppe jeweils ohne Markierung und mit absichtlich im Scanbereich platzierten Markierungen gemessen. Dabei wurden zwei Striche von jeweils 1 cm Länge mit einem Abstand von 2 cm untereinander auf das Blatt gezeichnet. Die LIF-Scanmessungen fanden bei allen verfügbaren Wellenlängen des Demonstrators statt.

Fluoreszenz der Messmarkierung Auf der Stahlplatte, welche als Referenzmuster diente, wurde eine Markierung mit dem DVD-Marker gemacht, mit dem auch der Scanbereich der Weinblätter markiert wurde. An der Markierung auf der Referenzplatte wurden LIF-Punktmessungen bei allen vom Demonstrator verfügbaren Wellenlängen durchgeführt.

3.5.10 Distanzabhängigkeit der laserinduzierten Fluoreszenz

Für die Messungen in diesem Versuch wurde ein Blatt einer Topfrebe der nicht inokulierten Kontrollgruppe verwendet. Die Topfrebe wurde analog zu den Versuchen der Messroutine auf dem Messstativ positioniert und ein Blatt der Rebe im Messpunkt fixiert. Bei der Kombination aller Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355, 532 und 1064 nm) wurden Punktmessungen auf der Blattmitte durchgeführt.

Der Messpunkt wurde nach jeder Messung durch Bewegung des Messtativs ausgehend von 160 cm in 20 cm-Schritten bis zu einer minimal möglichen Entfernung von 40 cm zum Scanspiegel hin verschoben. Dabei wurde vor jeder Messung eine Kalibrierung des Scanspiegels vorgenommen und der Strahl neu auf den Messpunkt ausgerichtet.

3.5.11 Auswirkungen des Messzeitpunktes zu verschiedenen Tageszeiten

Die markierten Blätter einer gesunden Topfrebe aus der Kontrollgruppe und einer inokulierten Rebe wurden nach der üblichen Messroutine an einem Tag zu den Uhrzeiten 9, 13 und 17 Uhr gemessen. Dabei fanden LIF-Scanmessungen bei Anregungswellenlänge von 355 nm statt.

3.5.12 Fluoreszenzunterschiede innerhalb einer Rebe

In diesem Versuch wurden zehn Blätter einer Topfrebe aus der inokulierten Gruppe gemessen. Dabei wurden LIF-Punktmessungen bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm mit dem Labordemonstrator durchgeführt.

3.5.13 Scanmessung einer Weinrebe

Eine gesunde Topfrebe der Kontrollgruppe und eine Topfrebe aus der inokulierten Gruppe wurden mit LIF-Scanmessungen bei allen Wellenlängen des Labordemonstrators gemessen. Der Scanbereich wurde dabei auf die gesamte Topfrebe (35 cm) ausgeweitet.

3.5.14 Feldmessungen im Weinberg

Der Labordemonstrator wurde in einem Weinberg am Ende von zwei Rebzeilen aufgebaut (**Abbildung 12**). Dabei wurde der Demonstrator so vor einer Rebzeile positioniert, dass sich die Weinblätter auf dem vorjustierten Abstand 160 cm befinden. Der Scanbereich des Scanspiegels wurde auf die Höhe der Weinreben eingestellt. Die Stromversorgung des Demonstrators wurde durch einen Benzingerator gewährleistet. Es wurde eine LIF-Punktmessung bei Tageslicht, sowie LIF-Scanmessungen bei Nacht durchgeführt.



Abbildung 12. vinoLAS-Labordemonstrator zwischen zwei Rebzeilen bei Feldmessungen im Weinberg bei Dämmerung.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Lasersystems

In diesem Abschnitt wird das Lasersystem des vinoLAS-Demonstrators, bestehend aus Lasermodul 1 und 2 anhand von Messungen der Leistungen, Linienspektren, Strahlprofilen und Untersuchungen der Laserpulse charakterisiert.

4.1.1 Leistungsmessungen

Mit einem Leistungsmessgerät mit Photodioden-Messkopf wurden die Dauerleistungen aller Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355, 532, 1064 nm), sowie des Lasermoduls 2 (236, 1064 nm) bestimmt. Die Messungen fanden während der Entwicklung des optischen Aufbaus, sowie am zu Beginn und Ende der Messkampagne statt. Während der Entwicklung des Aufbaus wurden die Leistungen der Wellenlängen nach ihrer Separation vom Hauptstrahl hinter der Bandpassfiltern (**Abbildung 7**) und während der Messkampagne nach Auskopplung des Anregungsstrahls am Messpunkt des Blatts bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 1** tabellarisch dargestellt.

Tabelle 1. Gemessene Dauerleistungen der Nd:YAG-Laser, der einzelnen Wellenlängen im optischen Aufbau nach der Wellenlängenseparation und nach Auskopplung am Messpunkt außerhalb des Aufbaus an verschiedenen dpi (days post inoculation) der Messkampagne.

Wellenlänge / nm	Leistung nach Separation / mW	Leistung Messpunkt 1 dpi / mW	Leistung Messpunkt 14 dpi / mW
236	(0.41 ± 0.03)	-	-
355	(7.16 ± 0.36)	(2.18 ± 0.11)	(1.88 ± 0.09)
473	(8.69 ± 0.26)	(1.81 ± 0.05)	(1.75 ± 0.05)
532	(43.40 ± 1.30)	(24.90 ± 0.75)	(22.85 ± 0.68)
1064	(24.47 ± 1.71)	(6.65 ± 0.46)	(5.62 ± 0.39)

Bei Vergleich der Leistungsmessungen in **Tabelle 1** fällt auf, dass die Leistung der Wellenlänge 236 nm die geringste ist und nur innerhalb des Aufbaus bestimmt wurde. Der Grund für das Fehlen der Leistungsergebnisse am Messpunkt ist der Verlust dieser Wellenlänge beim Strahltransport zum Scan- und Detektionsmodul, sowie beim Auskoppeln. Es existierten zum Zeitpunkt der Entwicklung keine Spiegeloptiken, die sowohl im optischen, als auch im UV-C- und NIR-Bereich ausreichend reflektierten. Die höchste Leistung in den Lasermodulen besaß die Wellenlänge 532 nm. Die gesamte Ausgangsleistung der vereinten Wellenlängen der beiden Laser wurde nicht bestimmt, da das Messgerät für eine Messung auf die Kalibrierung einer Wellenlänge zurückgriff. Zwischen den Messungen im optischen Aufbau und des ausgekoppelten Anregungsstrahls im Messpunkt kam es zu deutlich Verlusten, welche im Durchschnitt bei 66 % liegen. Der größte Verlust in diesem Schritt findet bei der Wellenlänge 473 nm statt. Die geringeren Leistungen treten vermutlich

durch Verluste an Spiegeln bei der Auskopplung, sowie durch eine Abschattung des Breadboards bei der Justage der Laser durch das Lochrastrer auf. Die Veränderungen der Leistungen vom Anfang zum Ende der Messkampagne betragen im Mittel 10 % und sind wahrscheinlich eine Folge von Staubablagerungen auf den Optiken.

4.1.2 Spektrale Betrachtungen

In diesem Teilabschnitt soll eine spektrale Betrachtung der Anregungswellenlängen des Lasersystems vom Labordemonstrator erfolgen. Dazu wurden Spektren jeder Wellenlänge des Lasermoduls 1 (355, 532, 1064 nm) einzeln aufgenommen und in **Abbildung 13 (a)** aufgetragen. Für das Lasermodul 2 fand keine Wellenlängenselektion statt, sodass Anteile des Strahls bei 236 nm im Spektrum von 473 nm auftreten würden. In **Abbildung 13 (b)** sind alle Wellenlängen des Lasermoduls 1 bei einer einzigen Messung abgebildet. Die Messung erfolgte durch das Kompaktspektrometer des Demonstrators, welches für diesen Versuch aus dem Scan- und Detektionsmodul ausgebaut wurde.

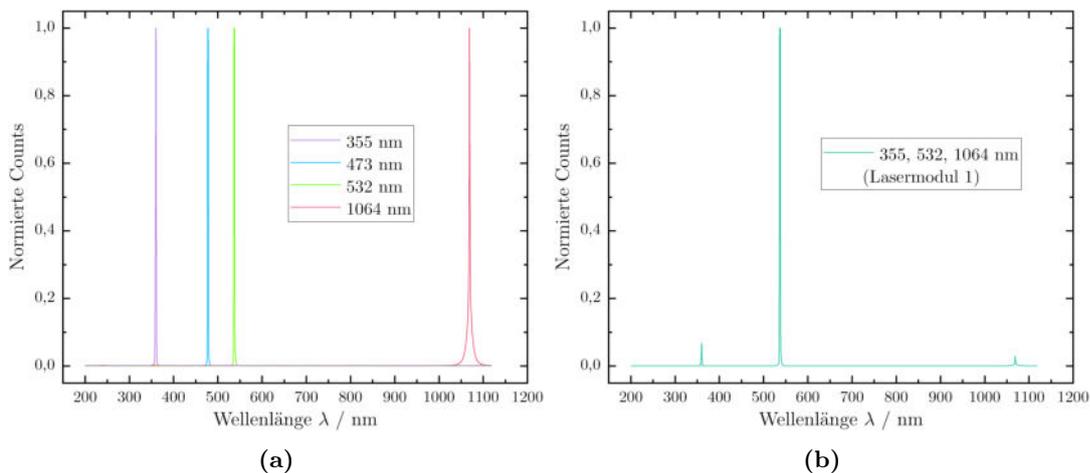


Abbildung 13. (a): Spektren aller im vinoLAS-Labordemonstrator verwendeten Wellenlängen (355, 473, 532 und 1064 nm). (b): Spektrum aller Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355, 532 und 1064 nm) im Verhältnis. Das Intensitätsmaximum jedes Spektrums wurde auf 1 normiert. Aufnahme im Zeitraum der Messkampagne am Messpunkt.

Die Spektren in **Abbildung 13 (a)** belegen, dass alle Wellenlängen, außer 236 nm, des Demonstrators am Messpunkt vorliegen und zur LIF-Anregung verwendet werden können. Frühere Messungen von Spektren der Laser bei Fertigstellung der Lasermodule und vor dem Zusammenbau des finalen Labordemonstrators konnten bei Auskopplung der Strahlen zeigen, dass der Strahl mit der Wellenlänge 236 nm Teil der Auskopplung und parallel zum Strahl mit der Wellenlänge 473 nm war. Das Spektrum in **Abbildung 13 (a)** belegt jedoch die Ergebnisse der Leistungsmessungen in **Unterunterabschnitt 4.1.1** und zeigt, dass bei 236 nm keine signifikante Anzahl von Sensorcounts aufgezeichnet wurde. Die Lasersignale zeigen im Spektrum dünne Linien monochromatischer Strahlung mit hoher Intensität zum Rauschniveau des Sensors. Eine Ausnahme stellt das Lasersignal der Wellenlänge

1064 nm dar, welches im unteren Bereich verbreitert ist. Der Grund für diese Verbreiterung sind vermutlich homogene Sättigungseffekte.³³ In **Abbildung 13 (b)** lassen sich die Intensitätsverhältnisse der einzelnen Wellenlängen des Lasermoduls 1 erkennen. Analog zu den Leistungen in **Tabelle 1** stellt die Wellenlänge 532 nm hier das intensivste Signal mit der größten Anzahl an Sensorcounts dar. Während der 355 nm-Strahl eine geringere Leistung hat, erreicht diese Wellenlänge eine höhere Countzahl als 1064 nm. Gründe dafür können die Verbreiterung des 1064 nm-Signals, oder Fehler in der Kalibrierung des Leistungsmessgerätes oder des Spektrometers sein.

4.1.3 Bestimmung von Strahlprofilen

In diesem Abschnitt sollen die Strahlprofile der verwendeten Laserwellenlängen 236, 355, 473, 532 und 1064 nm untersucht werden. Diese wurden sowohl bei Entwicklung des optischen Aufbaus nach der Wellenlängenseparation hinter den Bandpassfiltern durch eine Knife-Edge Messung, als auch vom fertigen Demonstrator-Aufbau im Messpunkt durch eine Beam Profiling Kamera bestimmt.

Knife-Edge Messungen: Zur Bestimmung der Strahlprofile mittels Knife-Edge Messung wurde im optischen Aufbau für jede Wellenlänge eine Klinge hinter dem Bandpassfilter installiert und der Laserstrahl vollständig abgeschattet. Durch das Verschieben der Klinge in 5 µm-Schritten wurde der Durchmesser des Laserstrahls Stück für Stück auf eine Photodiode freigegeben und die Leistung bestimmt. Daraus wurden Leistungsmessdaten P mit einem sigmoidalen Verlauf über die Verschiebung x erhalten. Durch die Ableitung von P nach x wurden aus diesen Daten Glockenkurven erhalten, welche mit einer Gaußfunktion angepasst wurden. Der Strahldurchmesser der Laser wurde als Breite der Gaußfunktion bei einem Maß von $1/e^2$ des Maximums dieser festgelegt. In **Abbildung 14** sind die Gaußangepassten Ableitungen der Messdaten aller Wellenlängen dargestellt. Die mit der Knife-Edge-Methode ermittelten Strahldurchmesser liegen im Bereich von 26 bis 286 µm. Der Strahl mit 236 nm hat den schmalsten und der Strahl mit 473 nm den breitesten Durchmesser. Die nach der Verschiebung x abgeleiteten Leistungen P verhalten sich in erster Näherung für die Wellenlängen 236, 355, 532 und 1064 nm nach einer Gaußkurve. Durch die Anpassung mit einer Lorentz- oder Voigtfunktion wäre womöglich eine bessere Annäherung der Fitfunktion an das Maximum der Messwerte möglich gewesen. Da der Strahldurchmesser allerdings bei rund 13.5 % bestimmt wird, ist eine Auswertung mittels Gaußfunktion in diesem Fall ausreichend. Die Messdaten des Strahls bei einer Wellenlänge von 473 nm weichen unter allen bestimmten Profilen am stärksten von der idealen Gaußkurve ab. Der Glockenverlauf dieser Daten ist stark verbreitert und verzerrt, was eine Auswertung nach dieser Methode erschwert.

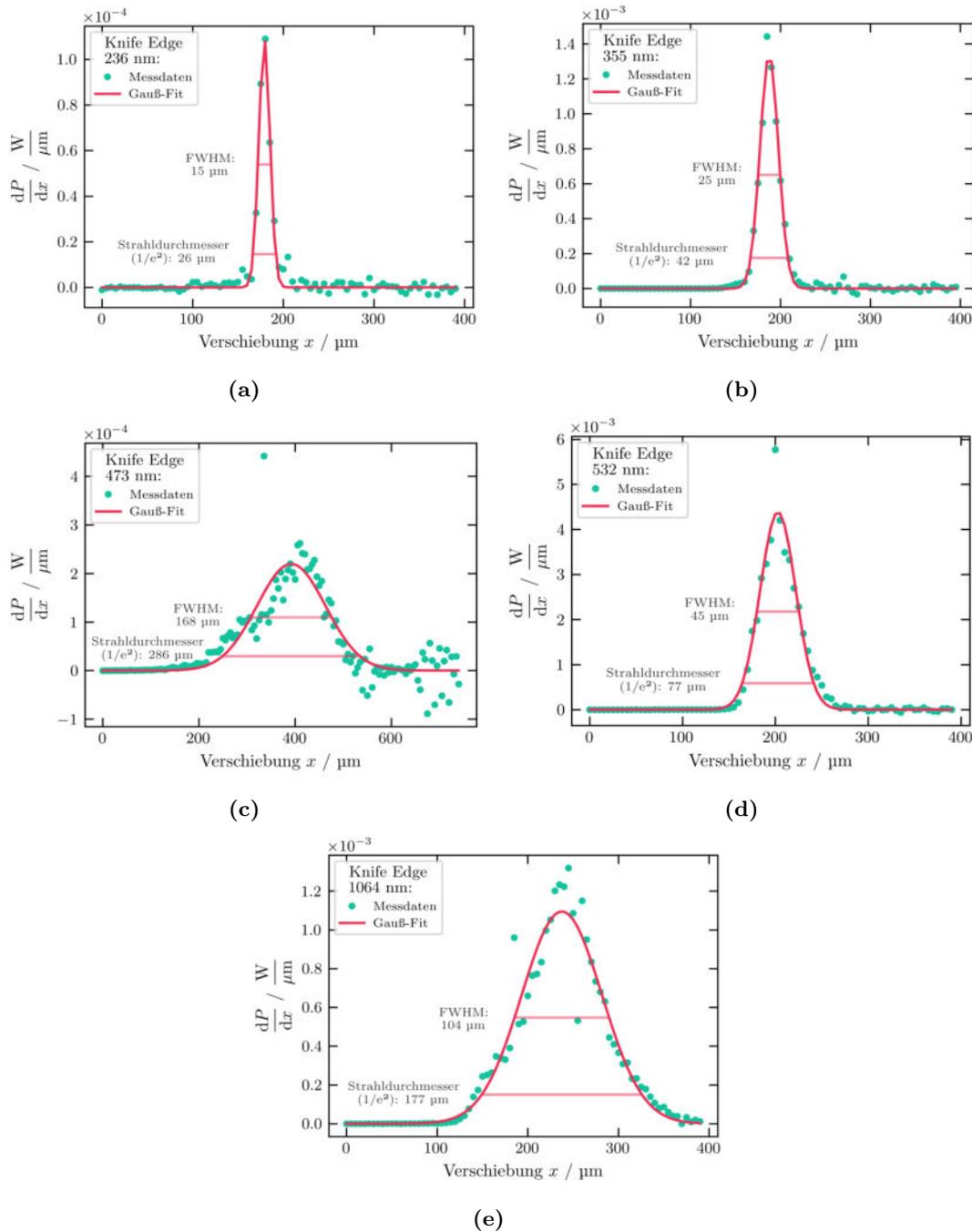


Abbildung 14. Eindimensionale Strahlprofile aus den Knife-Edge Messungen der Wellenlängen 236, 355, 473, 532 und 1064 nm innerhalb der Lasermodule 1 und 2. Die gemessenen Leistungen wurden nach der Verschiebung x abgeleitet und die erhaltenen Banden mit einem Gauß-Fit versehen. Der Strahldurchmesser wurde durch die Bandenbreite bei $1/e^2$ bestimmt.

Bestimmung mittels Beam Profiling Kamera: In diesem Teilabschnitt wurden die Profile ausgekoppelten Laser der (Anregungs-)Laserwellenlängen 355, 473, 532 und 1064 nm des Demonstrators mit einer Beam Profiling Kamera im Messpunkt bestimmt. Das Auslesen des CMOS-Sensors der Kamera lieferte zweidimensionale Informationen von Sensorcounts, was zu einem Bild des Strahlprofils mit Intensitätsinformation führte. Durch einen Optimierungsalgorithmus in der herstellereige-

nen Kamerasoftware wurde jeweils eine Linie durch den breitesten und schmalsten Punkt des Profil gelegt und die Daten auf diesen Linien exportiert. Die erhaltenen Glockenkurven wurden mit einer Voigt-Funktion angepasst und der Strahldurchmesser anhand dieser Kurve analog zu **Absatz 4.1.3** auf einer Höhe von $1/e^2$ bestimmt. Die erhaltenen Profile und Strahldurchmesser sind in **Abbildung 15** dargestellt.

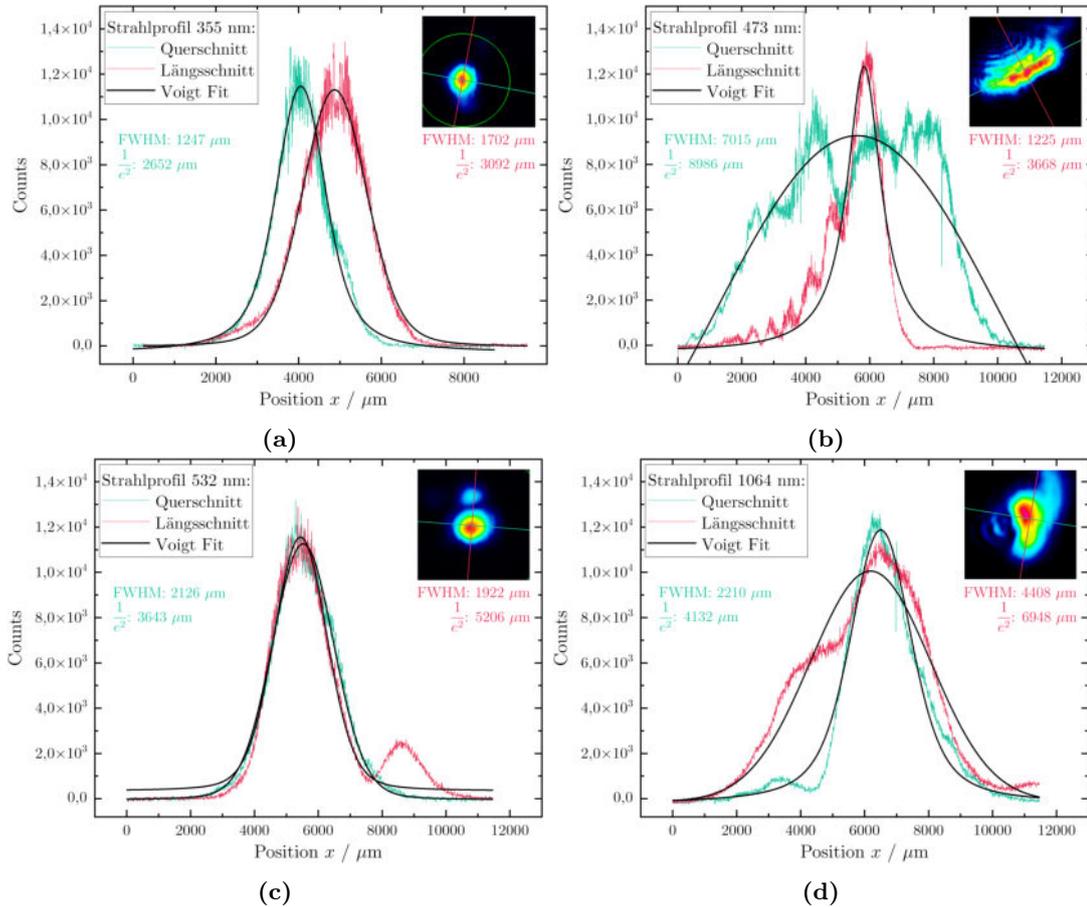


Abbildung 15. Zweidimensionale Strahlprofile der zur Messkampagne verwendeten Anregungswellenlängen 355, 473, 532 und 1064 nm am Messpunkt. Die Profile wurden mit einer Beam Profiling Kamera aufgenommen, mit einem Voigt-Fit versehen und der Strahldurchmesser über die Bandenbreite bei $1/e^2$ bestimmt.

Ähnlich zu den Strahlprofilen in **Abbildung 14** lassen sich die Wellenlängen 355 und 532 nm gut durch die angepassten Funktionen beschreiben. Auch bei diesen Messungen stellt die Auswertung der Wellenlänge 473 nm eine Herausforderung dar, dass sich das breite Profil nicht durch die Voigt-Funktion beschreiben lässt. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der Strahlprofile aus **Absatz 4.1.3**. Es ist möglich, dass die Verbreiterung des Strahls bei 473 nm durch eine Fehljustage im optischen Aufbau zustande kommt. Das Wellenförmige Muster im Bild des Strahls in **Abbildung 15 (b)** ähnelt einem Interferenzmuster, was auf das Treffen des Strahls auf z.B. eine Spiegelkante deuten könnte. Die ermittelten Strahldurchmesser von 286 und 8986 μm zeigen, dass der Strahl stark zwischen dem Bandpassfilter im Aufbau und dem Messpunkt auf 160 cm Entfernung vom

Scanspiegel divergiert. Bei einer solch hohen Divergenz liegt es nahe, dass die in **Tabelle 1** beschriebenen Leistungsverluste dieser Wellenlänge durch die Abschattung des Strahls am Loch des Breadboards verursacht werden. Dieses hat einen Durchmesser von 3 mm. Das Interferenzmuster kann ebenso durch das Treffen auf die Kanten dieses Lochs entstanden sein. Da ein Teil der Laserintensität trotzdem den Messpunkt erreichte, wurde mit dieser Konfiguration fortgefahren.

4.1.4 Untersuchung der Laserpulse am Oszilloskop

In diesem Teilabschnitt werden die Ergebnisse der Messungen von Frequenz und Pulsbreite der Laserpulse vorgestellt. Dafür wurde das Output-Triggersignal des Lasers direkt mit dem Oszilloskop verbunden und das Lasersignal mit einer Photodiode gemessen, welche auch mit dem Oszilloskop verbunden war. Für die Messungen wurden alle Wellenlängen des jeweiligen Lasermoduls verwendet. Beispielhaft ist jeweils das Signal des Lasertriggers und eines Laserpulses auf der Photodiode in **Abbildung 16** abgebildet.

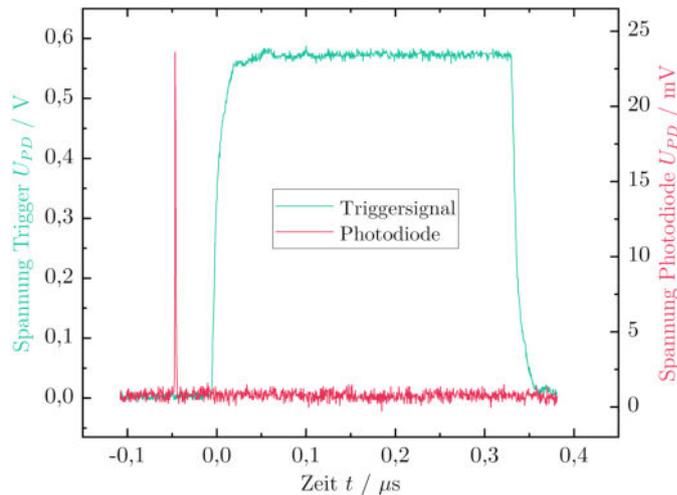


Abbildung 16. Darstellung der Pulse des Lasermoduls 2 der Messungen am Oszilloskop. Laserpuls (rot) bestimmt mit einer Photodiode und Output-Triggersignal des Lasers.

In **Abbildung 16** lässt sich erkennen, dass das Signal der Photodiode zeitlich vor dem Trigger erscheint. Aus unbekanntem Grund wird das Signal des Lasertriggers im Treiber des Lasers generell um (49.55 ± 2.00) ns verzögert. Für die Fluoreszenzdetektion im Demonstrator mit dem 4-Kanal Detektor musste das Fluoreszenzsignal daher durch einen Lichtwellenleiter verzögert werden, um die Funktion des Integrators zu gewährleisten. Die bestimmten Werte für die Pulsfrequenzen und die Pulsbreiten sind in **Tabelle 2** aufgelistet.

Tabelle 2. Mit dem Oszilloskop gemessene Werte für die Pulsfrequenzen und Pulsbreiten des Output-Triggersignal der Laser und der Photodiode (Laserpuls) für das Lasermodul 1 (355, 532 und 1064 nm) und das Lasermodul 2 (236 und 473 nm).

	Laserm modul 1	Laserm modul 2
Pulsfrequenz Trigger f_T	(5.00 ± 0.09) kHz	(4.99 ± 0.01) kHz
Pulsfrequenz Diode f_D	(4.88 ± 0.58) kHz	(4.98 ± 0.04) kHz
Pulsbreite Trigger $t_{PB,T}$	(192.46 ± 2.00) ns	(331.73 ± 2.00) ns
Pulsbreite Diode $t_{PB,D}$	(15.54 ± 0.05) ns	(0.87 ± 0.05) ns

Die gemessenen Pulsfrequenzen f_T und f_D der Laser in **Tabelle 2** liegen alle im Bereich um 5 kHz und entsprechen damit der vom Hersteller angegebenen Frequenz. Anhand der Werte für die Pulsbreiten t_{PB} lässt sich erkennen, dass das Lasermodul 1 einen zeitlich deutlichen längeren Laserpuls als das Lasermodul 2 emittiert, das Triggersignal jedoch kürzer ist.

4.2 Detektion von *Plasmopara viticola* am Beispiel eines Riesling-Blattes

Mit dem finalen Aufbau des vinoLAS-Labordemonstrators wurden LIF-Scanmessungen auf der Oberseite eines gesunden, nicht inokulierten, und eines befallenen Riesling-Blattes zwei unterschiedlicher Topfreben durchgeführt. Dabei wurde das Blatt auf einem ebenen, schwarzen Untergrund vertikal fixiert und durch das Schwenken des Anregungslasers über einen Scanspiegel in einem definierten Bereich gescannt. Die Messungen fanden bei allen verfügbaren Laserwellenlängen (355, 473, 532 und 1064 nm) statt. Über eine Anregungszeit von 20 s wurde die Fluoreszenz mit dem Spektrometer und dem 4-Kanal Detektor aufgenommen. Analog zu den Messungen am Riesling-Blatt wurde vor jeder Anregungsmessung eine Referenzmessung durchgeführt, bei der der Anregungslaser auf mattschwarz lackierten Stahl traf. Für diesen Teil der Auswertung werden wegen der Signifikanz der Daten nur die Ergebnisse der Anregungswellenlängen 355 und 532 nm betrachtet. Die mit dem Spektrometer detektierten Referenzintensitäten wurden von den LIF-Intensitäten subtrahiert. Ausreißer-Signale von defekten Elementen des CCD-Zeilensensors des Spektrometers wurden aus den Datensätzen gelöscht. Irrelevante Bereiche der Spektren, an denen keine Fluoreszenzsignale auftraten, wurden ebenfalls gekürzt. Die Emissionsspektren wurden mit einem Savitzky-Golay-Filter (Polynom 2. Grades, 31 Punkte breites Schiebefenster) geglättet. Die Ergebnisse des Spektrometers sind in **Abbildung 17** aufgetragen.

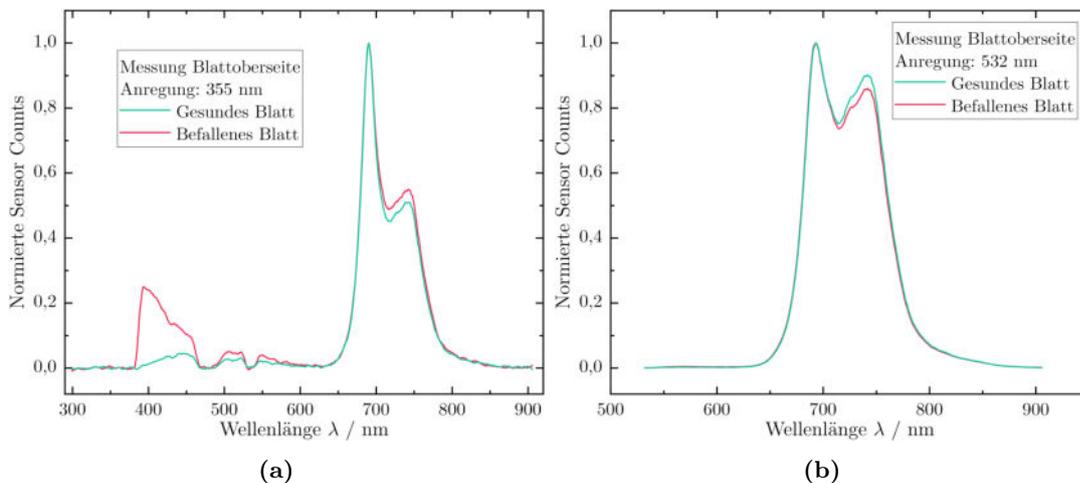


Abbildung 17. LIF-Spektren der Scanmessungen auf der Oberseite von Riesling-Blättern mit starkem Befall und ohne sichtbare Symptome bei den Anregungswellenlängen von 355 und 532 nm. Die Sensorcounts wurden auf 1 normiert.

Bei der Fluoreszenzanregung mit 355 nm zeigen beide Spektren in **Abbildung 17** Fluoreszenzbanden der blau-grünen Fluoreszenz (BGF) um 440 und 520 nm und der Chlorophyll-Fluoreszenz (ChlF) bei um 685 und 735 nm. Die BGF lässt sich in Form von Emissionsbanden in den Bereichen 380-470 und 490-500 nm in zwei Banden erkennen. Die beiden Signale der BGF werden überwiegend von der Ferulasäure emittiert, welche kovalent an die Zellwände des Blattmaterials gebun-

den ist.³⁴ Die Intensitätseinbrüche hinter den beiden BGF-Banden sind außerdem durch den Einsatz der Notchfilter bei den Wellenlängen 473 und 532 nm auf der Detektionsseite zu erklären. Da die Fluoreszenzanregung nur im UV-A-Bereich (355 nm) stattfindet, kommt es nicht zur Fluoreszenz ausgehend von aromatischen α -Aminosäuren Tyrosin (300-320 nm) und Tryptophan (320-350 nm).⁷ Die beiden ausgeprägten und sich überlagernden Banden im Bereich von 650 bis 800 nm werden durch die Chlorophyll-Fluoreszenz hervorgerufen.²⁶

Beim Vergleich der Spektren lässt sich ein deutlicher Unterschied sowohl in den Intensitäten der BGF, als auch in der spektralen Lage der Intensitätsmaxima erkennen. So ist das Signal der BGF beim befallenen Blatt um ein vielfaches intensiver als das des gesunden Blattes. Auch die normierten Sensorcounts der zweiten Bande der ChlF weicht vom gesunden zum befallenen Zustand signifikant mit höheren Werten ab. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in den Emissionsspektren der Anregung bei 532 nm wieder, dort überwiegen allerdings die Counts des gesunden Blattes. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren bei ihrer maximalen Intensität der Sensorcounts ChlF auf den Wert 1 normiert und die Fluoreszenzsignale nach **Gleichung 16** in vier Kanälen integriert.⁵ Die Grenzen der Integrale in der Auswertung dieser Arbeit wurden auf ein maximales Signal optimiert.

$$\begin{aligned}
 F_{Blau} &= \int_{382nm}^{469nm} f(\lambda)d\lambda, \\
 F_{Grün} &= \int_{491nm}^{527nm} f(\lambda)d\lambda, \\
 F_{Rot1} &= \int_{618nm}^{712nm} f(\lambda)d\lambda, \\
 F_{Rot2} &= \int_{712nm}^{867nm} f(\lambda)d\lambda
 \end{aligned} \tag{16}$$

Mit Hilfe der integrierten Fluoreszenzbanden F_{Blau} , F_{Rot1} und F_{Rot2} können nun der BFRR_UV-Index (Blue to Far Red Ratio, UV-Anregung) und das ChlF-Verhältnis in **Gleichung 17** gebildet werden. Diese beiden etablierten Indizes werden in dieser Arbeit als Indikator für physiologische Veränderung im Pflanzenmaterial der Topfreben, vor allem durch die Veränderung der Chlorophyllkonzentration in den Zellen verwendet.⁶

$$\begin{aligned}
 \text{BFRR_UV-Index} &= \frac{F_{Blau}}{F_{Rot2}}, \\
 \text{ChlF-Verhältnis} &= \frac{F_{Rot1}}{F_{Rot2}}
 \end{aligned} \tag{17}$$

Da für die Bildung des BFRR_UV-Indexes eine Fluoreszenzanregung im UV-Bereich, bzw. F_{Blau} benötigt wird, werden die Ergebnisse aus LIF-Messungen bei 355 nm in dieser Arbeit mit diesem Index diskutiert. Da die ChlF bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm die intensivsten Signale zeigte werden die Ergebnisse dieser Anregungswellenlänge mit Hilfe des ChlF-Verhältnisses diskutiert.

Die LIF-Scanmessung des gesunden Blattes ergibt einen BFRR_UV-Index von 72.41×10^{-3} . Durch die deutlich höhere BGF erreicht das befallene Blatt einen Index von 388.16×10^{-3} . Der 5.4-fach höhere Index der Blattes mit einem sichtbaren Befall von *Plasmopara viticola* lässt sich auf die Bildung von Phytoalexinen zurückführen. Als bekannteste Stoffgruppe der Phytoalexine werden Stilbene von der Pflanze als Reaktion auf die Infektion mit Pathogenen gebildet.³⁵ Diese produzierten Moleküle neigen zur Fluoreszenz bei der Anregung durch UV-Strahlung und erreichen bei *In-vivo*-Messungen ein Emissionsmaximum bei 400 nm.^{36,37} Es ist anzunehmen, dass die Weinreben diese Stoffe gegen die Infektion mit *Plasmopara viticola* bilden, welche bei Befall mit falschem Mehltau zu einer erhöhten BGF führen. Das Emissionsmaximum bei 394 nm des Befallenen Blattes in **Abbildung 17 (a)** ist demnach wahrscheinlich ein Signal dieser Phytoalexine. Ebenfalls ist es möglich, dass das Pilzmaterial, welches sich nach Inokulation im Blatt verteilt hat fluoresziert.²⁹ Untersuchung dazu finden in **Unterunterabschnitt 4.4.4** statt. Bei der Fluoreszenzanregung mit einer Wellenlänge von 532 nm, lassen sich in **Abbildung 17 (b)** beim befallenen Blatt niedrigere Werte von F_{Rot2} feststellen. Das ChlF-Verhältnis beträgt 65.24×10^{-2} für das befallende Blatt und ist damit um rund 4.9 % im Vergleich zum gesunden Blatt (60.06×10^{-2}) erhöht. Quantitativ bestätigen die gemessenen Werte des ChlF-Verhältnisses die Literaturwerte, welche einen Bereich von 0.4 bis 5 liegen.²⁴ Wobei diese auch von der Wellenlänge der anregenden Strahlung abhängen.³⁸ Die Erhöhung des ChlF-Verhältnisses lässt sich auf die Abnahme des Chlorophyll-Gehaltes durch die Infektion mit dem Pathogenen *Plasmopara viticola* zurückführen.²⁴ Frühere Arbeiten von Gitelson et al. konnten nachweisen, dass das ChlF-Verhältnis linear abhängig zum Chlorophyllgehalt in Pflanzen ist, da rund 90 % der emittierten Fluoreszenz im Bereich F_{Rot1} durch vorhandenes Chlorophyll in den Pflanzenzellen reabsorbiert wird. Bei einem geringeren Chlorophyllgehalt wird weniger Fluoreszenzlicht im Bereich F_{Rot1} durch das Chlorophyll absorbiert, was zu einem erhöhten ChlF-Verhältnis führt.³⁹ Die Daten des 4-Kanal Detektors konnten aufgrund eines Treiberfehlers nicht korrekt aufgezeichnet werden, sodass nur vereinzelte Messungen auswertbare Daten lieferten. Beispielhaft sind die Messdaten einer LIF-Scanmessung eines befallenen Blattes in **Abbildung 18** aufgetragen.

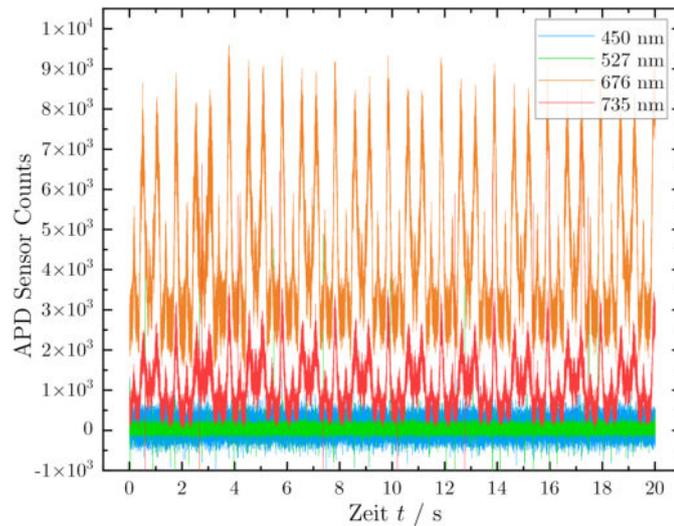


Abbildung 18. Messdaten der vier APD-Sensoren des 4-Kanal Detektors aus einer LIF-Scanmessung einer befallenen Topfrebe bei den Laserwellenlängen 355, 532 und 1064 nm.

Abbildung 18 zeigt die Signale der vier durch Filter ausgelegten Fluoreszenzkanäle bei 450, 527, 676 und 735 nm. Die Datensätze der Kanäle der ChlF bei 676 und 735 nm sind von deutlich höherer Zahl an Sensorcounts als die Kanäle der BGF (450 und 527 nm). Weiterhin ist die Countzahl des Kanals bei 676 nm (Wellenlängenbereich F_{Rot1}) größer als die des Kanals bei 735 nm (Wellenlängenbereich F_{Rot2}). Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen des Spektrometers in **Abbildung 17 (a)**. Es fällt auf, dass sich die ChlF-Signale über die Zeit in einem Auf- und Abmuster verändern. Diese periodischen Änderungen der Sensorcounts ist auf die LIF-Scanmessung zurückzuführen. Da der Anregungslaser während der Scan- und Integrationszeit von 20 s zehn Mal über die Blattoberfläche geschwenkt wurde, kam es zu verschiedenen Zeiten zur Anregung unterschiedlicher Blatta-reale mit anderer Fluoreszenzsignatur. Dies ist in der zehnfachen Wiederholung des Fluoreszenzmusters zu erkennen. Die Signale der BGF weisen aufgrund ihrer geringen Intensität kein solch periodisch Muster auf und werden vom Rauschen überlagert. Die Daten des Kanals bei 527 nm enthalten kein Signal der BGF, da dieser Wellenlängenbereich durch den Notchfilter für die Laserwellenlänge 532 nm absorbiert wird. Für eine weitere Auswertung könnten die Signale der einzelnen Kanäle gemittelt werden und nach neuen Messungen in Form der beschriebenen Indizes untereinander verglichen werden.

4.3 Ergebnisse der Messkampagne

4.3.1 Befall der Topfreben

Bei Erhalt zeigten alle Topfreben keine Symptome von falschem Mehltau, alle Blätter hatten eine satte, grüne Farbe. Dieser Zustand wurde über drei Tage bis zum Beginn der Messkampagne (−3 dpi) erhalten. **Abbildung 19 (a)** zeigt das Blatt einer noch gesunden Riesling-Topfrebe, welche im Verlauf der Messkampagne noch mit *Plasmopara viticola* inokuliert wurde, bei −3 dpi.

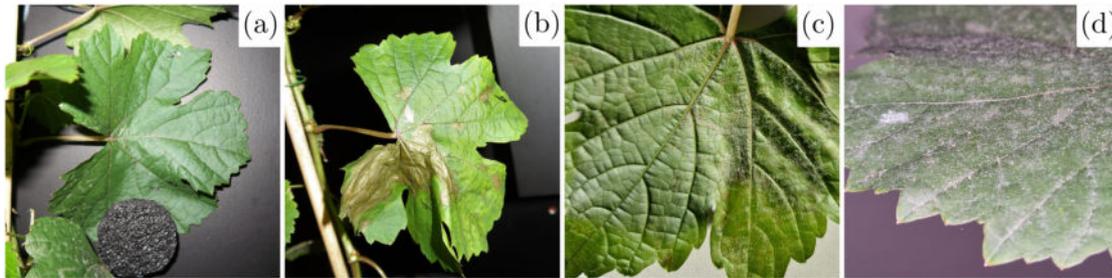


Abbildung 19. Fotos der Riesling-Blätter, welche während der Messkampagne starke Symptome zeigten. **(a):** Oberseite einer Probe aus der zu inokulierenden Gruppe, noch im gesunden Zustand zu Beginn der Messkampagne, drei Tage vor der Inokulation (−3 dpi, days post inoculation). **(b):** Befall von falschem Mehltau auf der Oberseite desselben Blattes, zum Ende der Messkampagne bei 13 dpi. **(c):** Befall mit falschem Mehltau auf der Unterseite eines anderen Blattes mit starken Symptomen. **(d):** Unbeabsichtigter Befall mit echtem Mehltau durch Querkontamination bei −1 dpi.

Zur Demonstration wurden für die Fotos in **Abbildung 19** Proben mit starken Symptomen gewählt. Andere befallene Proben zeigten teilweise sogar weder eine Verfärbung auf der Oberseite der Blätter noch einen Befall auf der Unterseite. Die Symptome waren sehr heterogen, im Mittel zeigte sich ein Befall aber ab 8 dpi in Form von Auswüchsen von Pilzsporen auf der Blattunterseite und eine leichte Gelbfärbung der Oberseite, nachdem die Pflanzen ein zweites mal über Nacht in eine befeuchtete Tüte eingehüllt wurden. Der Befall der Topfreben in der Messkampagne stellte sich als eher leicht heraus. Es war auffallend, dass bei den meisten inokulierten Reben ein stärkerer Befall an den oberen Blättern auftrat und die unteren Blätter nur sehr leichte Ausbrüche an den Blattadern zeigten. In **Unterunterabschnitt 4.4.1** und **Unterunterabschnitt 4.4.2** wird genauer auf den Befall eingegangen.

Das Foto in **Abbildung 19 (b)** zeigt dasselbe Blatt wie **(a)** bei 13 dpi. Dieses Blatt weist einen starken Befall von falschem Mehltau durch den Erreger *Plasmopara viticola* auf. Der Befall zeichnet sich vor allem durch eine Verfärbung der stärker infizierten Areale auf der Blattoberfläche, sowie Nekrotisierung des Blattmaterials aus. Bei der Handhabung dieser Blätter machte die Blattstruktur einen brüchigen Eindruck. Das Foto in **(c)** zeigt den Befall auf der Unterseite eines stark infizierten Blattes bei 10 dpi.

Schon bei Erhalt der Topfreben zeigte sich ein leichter Belag auf der Oberseite

der Blätter, welcher auch in **(a)** zu erkennen ist. Dieser stellte sich als Befall von echtem Mehltau (Erreger: *Erysiphe necator*) heraus. Das Foto in **(d)** zeigt eine Nahaufnahme dieses Befalls eines Blattes bei -2 dpi. Die Auswüchse des echten Mehltaus auf der Blattoberseite konnten mit einem feuchten Tuch bei -1 dpi abgewischt werden und traten während der gesamten Messkampagne nicht wieder auf.

Die beiden nicht bewässerten Topfreben aus jeder Gruppe der bekannten Proben zeigten keine visuellen oder haptischen Unterschiede zu den anderen Reben.

4.3.2 Auswertung der LIF-Messungen

Am vinoLAS-Labordemonstrator wurde der pathogene Befall durch falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) an Blättern der Riesling-Topfreben mittels LIF-Scanmessungen bestimmt. Die Gesamtheit der Proben bestand aus zehn gesunden, nicht inokulierten Topfreben und zehn Topfreben, die am vierten Tag der Messkampagne mit *Plasmopara viticola* inokuliert wurde. Die Kampagne fand über einen Zeitraum von 17 Tagen (-3 bis 13 dpi) statt. Zur LIF-Messung wurden die Anregungswellenlängen von 355 , 473 und 532 nm genutzt. Außerdem wurden Reflexionsmessungen bei 1064 nm, sowie eine Messung bei allen Wellenlängen des Lasermoduls 1 (355 , 532 und 1064 nm) durchgeführt. Zu jeder einzelnen Messung wurde eine Referenzmessung gemacht. Die Auswertung der Messungen erfolgte nach der in **Unterabschnitt 4.2** vorgestellten Methode anhand des BFRR_UV-Indexes und des ChlF-Verhältnisses. Auch die Datenverarbeitungen der Spektren war gleich. Nachdem das im Demonstrator verwendete Spektrometer zur Messung der Laserspektren in **Unterabschnitt 4.1.2** bei 2 dpi ausgebaut wurde, konnte nach Wiedereinbau eine optische Dejustage im Spektrum festgestellt werden. Alle Spektren ab diesem Zeitpunkt waren um 3 nm rotverschoben. Die Ergebnisse der Reflexionsmessung bei 1064 nm wurden zur Wellenlängennormierung aller weiterer Spektren verwendet, da diese nur die reflektierte Linie der Laserwellenlänge enthielten. Die Spektren aller Wellenlängen einer Probe aus der befallenen Gruppe sind in **Abbildung 20** dargestellt. Bei der Betrachtung der LIF-Emissionsspektren in **Abbildung 20 (a)** lässt sich ein Trend der Zunahme der BGF mit den DPI, vor allem aber ab 7 dpi erkennen. Diese Zunahme an Fluoreszenz ist auf die Bildung von Stilbenen als Reaktion der Pflanze gegen die Infektion, sowie der Verbreitung des Pilzmyzels in der Pflanze zurückzuführen. Auch in diesen Spektren sind die Intensitätseinbrüche durch die Notchfilter der Laserwellenlängen zu sehen. In diesem Spektrum findet eine Abnahme der ChlF mit den DPI statt. Diese Abnahme zeichnet sich auch in den Spektren der Anregungswellenlänge 473 nm in **(b)** ab. Augenscheinlich verändert sich das ChlF-Verhältnis nicht, eine gesonderte Auswertung darüber folgt in **Abbildung 21**.

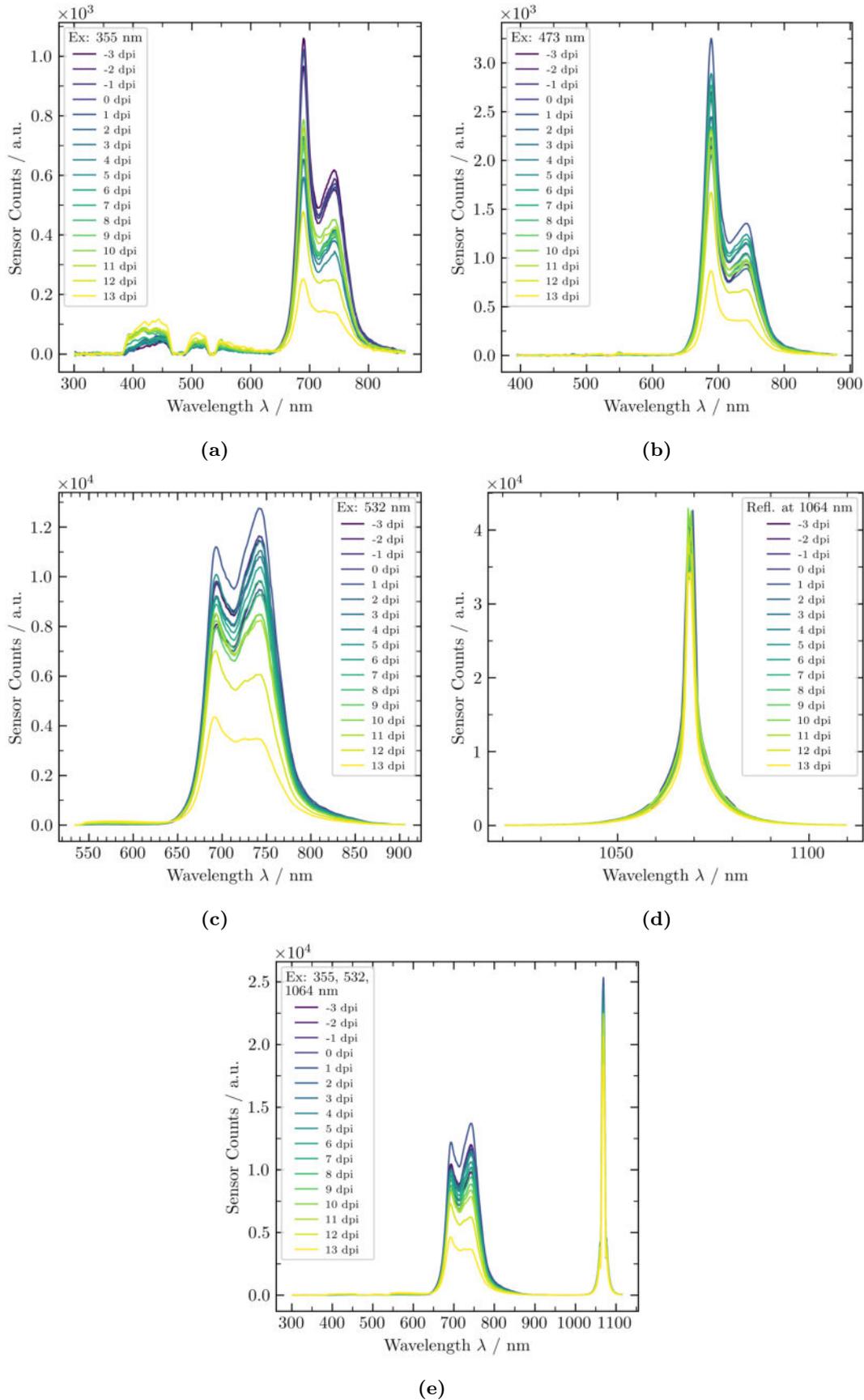


Abbildung 20. LIF-Spektren bei den Anregungswellenlängen 355, 473, 532 nm, sowie Reflexionsspektren bei 1064 nm einer befallenen Riesling-Probe über einen Zeitraum von 18 dpi (days post inoculation).

Auch bei der Fluoreszenzanregung mit 532 nm in **Abbildung 20 (c)** lässt sich eine Änderung der Sensorcounts der ChlF über die dpi feststellen, hier scheint sich allerdings auch das Verhältnis zu entwickeln. Die Reflexionswerte der Wellenlänge 1064 nm in **Abbildung 20 (d)** zeigen keine offensichtliche Änderung über die dpi. Das Spektrum der Messung mit allen Wellenlängen des Lasermodul 1 in **Abbildung 20 (e)** zeigt vergleichbar zu **Abbildung 20 (c)** einen Anstieg und eine Verhältnisänderung der ChlF, sowie einen Anstieg der Reflexion bei 1064 nm. Aus den Spektren aller Proben wurden die BFR_R_UV-Indizes und die ChlF-Verhältnisse gebildet und jeweils über alle Proben der beiden Inokulationsgruppen gemittelt. Mit der Standardabweichung sind diese Indizes in **Abbildung 21** dargestellt.

Die gemittelten BFR_R_UV-Indizes in **Abbildung 21 (a)** zeigen zu Beginn und in der Mitte der Messkampagne für die nicht inokulierten Proben eine erhöhte Standardabweichung. Diese könnte durch die Kontamination mit dem echten Mehltau zusammenhängen. Ab 8 dpi beginnen sich die Verläufe des Indexes zu trennen und die Werte für die befallenen Proben steigen stetig an, was für eine Erhöhung der BGF, bzw. eine Verminderung der ChlF spricht. Ab diesem Tag waren auch sichtbare Symptome zu verzeichnen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die BGF in **Abbildung 20 (a)** hauptsächlich durch die Ausbildung des Pilzmyzels gestiegen ist. Da die Pflanzen von Beginn an mit echtem Mehltau befallen waren, ist es wahrscheinlich, dass die BGF beider Gruppen vor Inokulation aus Emissionsanteilen der natürlich emittierenden Furalsäure und Phytoalexinen wie Stilbenen bestand. Die Standardabweichung der inokulierten Gruppe nimmt für alle Ergebnisse, bei denen mit 355 oder 532 nm angeregt wurde stark zu. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass die Proben der inokulierten Gruppe sehr heterogen befallen waren.

Die Ergebnisse der gemittelten ChlF der Anregung bei 473 nm in **Abbildung 21 (b)** zeigen eine hohe Standardabweichung über den gesamten Verlauf der Messkampagne. Ein Grund dafür könnte die verminderte Bestrahlungsstärke durch die schlechte Strahlqualität dieses Anregungsstrahls sein. Die Werte der gemittelten ChlF zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Inokulationsgruppen.

Die LIF-Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm ergaben die Ergebnisse der ChlF in **Abbildung 21 (c)**, welche von allen Messungen den geradlinigsten Verlauf und die am wenigsten veränderliche Standardabweichung besitzen. Ab 9 dpi lassen sich die Gruppen unterschiedlicher Befallszustände deutlich voneinander unterscheiden. Der Grund für die Erhöhung des ChlF-Verhältnisses bei Befall wurde bereits in **Unterabschnitt 4.2** beschrieben. Von -3 bis 9 dpi herrscht ein grundsätzlicher Versatz in der ChlF.

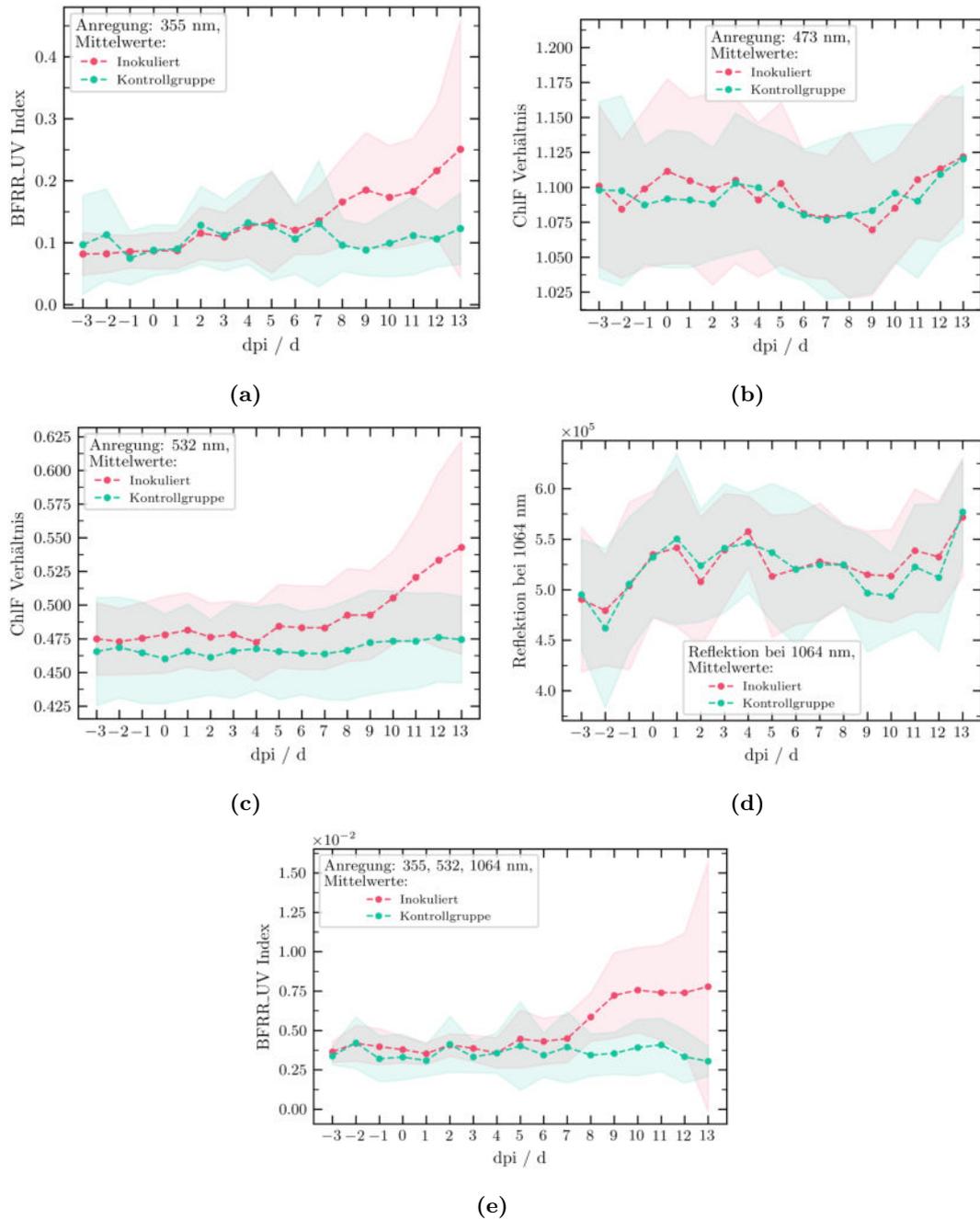


Abbildung 21. Darstellung der Ergebnisse des BFR UV-Indexes und des ChlF-Verhältnisses, sowie Ergebnisse der Reflexionsmessung der befallenen (inokulierten) Gruppe und der Kontrollgruppe über einen Zeitraum von 18 dpi (days post inoculation), bei allen verfügbaren Wellenlängen des vinoLAS-Labordemonstrators. Die Werte wurden über alle zehn Proben jeder Gruppe gemittelt und mit der Standardabweichung aufgetragen.

Die Ergebnisse der Reflexionsmessung bei 1064 nm in **Abbildung 21 (d)** zeigen eine relativ große Standardabweichung und keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Das lässt darauf schließen, dass sich die Oberflächenbeschaffenheit der Oberseite der Riesling-Blätter durch einen Befall nicht signifikant verändert. Der Anstieg der Werte über den Verlauf der Messkampagne hängt eventuell mit anderen Einflüssen, wie das Abwischen des echten Mehltaus oder dem Wassergehalt der Blätter zusammen.

Die gemittelten BFRR_UV-Indizes der Messungen bei allen Wellenlängen des Lasermoduls 1 in **Abbildung 21 (e)** zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Ergebnisse in **Abbildung 21 (a)** und **Abbildung 21 (c)**. Bei dieser Methode ist eine noch deutlichere Aufspaltung der bestimmten Werte unter den beiden Inokulationsgruppen ab 8 dpi zu erkennen. Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich die höhere Intensität der Fluoreszenzanregung, die das Chlorophyll durch die beiden Laserwellenlängen 355 und 532 nm erreicht hat.

Für eine statistischere Betrachtung der vorgestellten Ergebnisse sind diese weiterhin als Boxplots in **Abbildung 22** dargestellt.

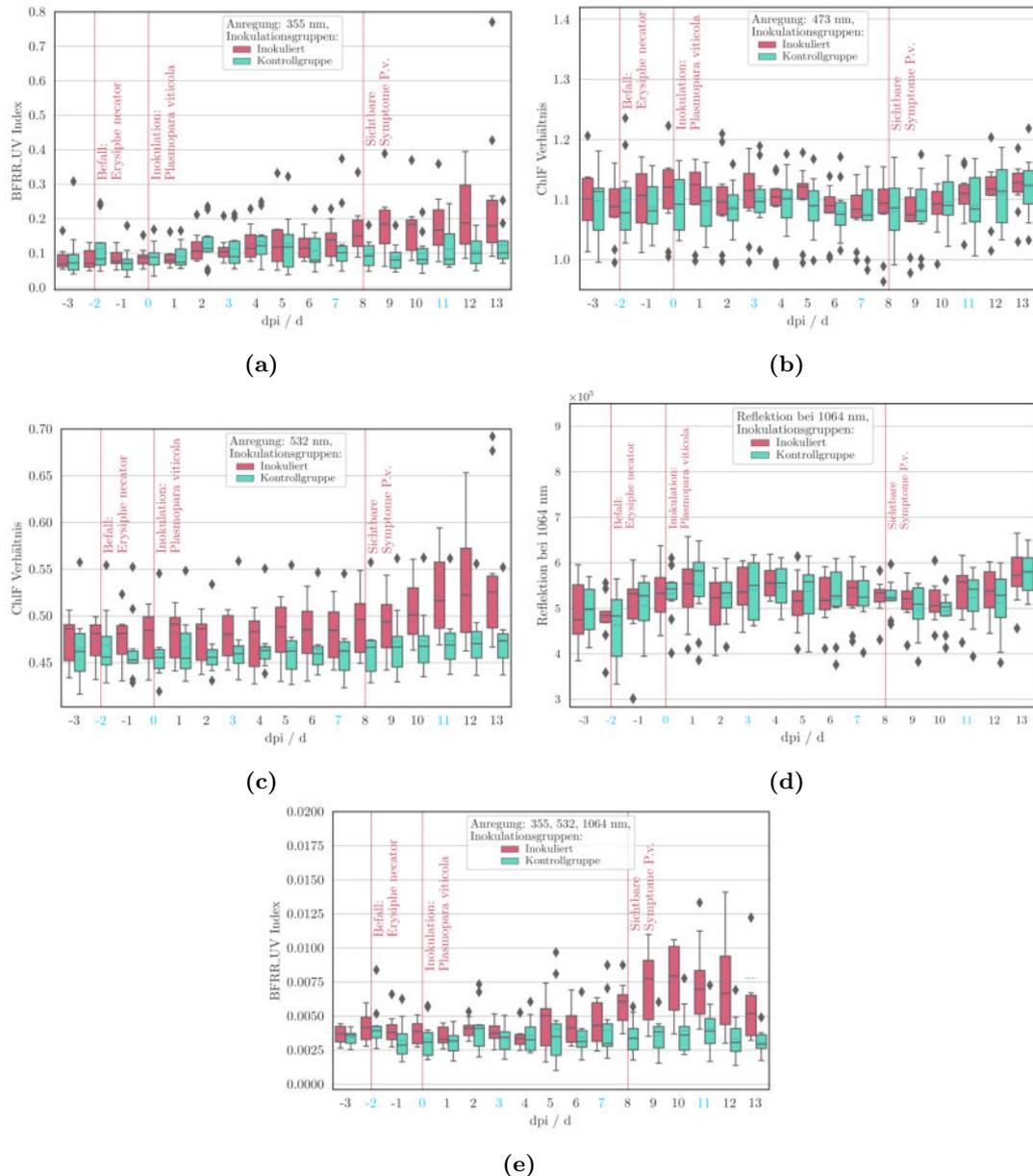


Abbildung 22. Boxplots des BFRR_UV-Indexes und des ChlF-Verhältnisses, bei den Anregungswellenlängen 355, 473 und 532 nm, aus den LIF-Messungen, sowie Reflexionsmessungen bei 1064 nm über einen Zeitraum von 18 dpi (days post inoculation) an jeweils zehn befallenen (inokulierten) und zehn gesunden (Kontrollgruppe) Riesling-Topfreben. Tage, an denen die Topfreben bewässert wurden, sind blau dargestellt. Ausreißer über einem Interquartilsabstand von 1 sind als Rauten und Mittelwerte als blaue Linien in den Boxen dargestellt.

Bei Betrachtung der Boxplots in **Abbildung 22** fällt auf, dass die interquartilen Abstände der inokulierten Gruppe der Anregungswellenlängen 355 und 532 nm in **(a)**, **(c)** und **(e)** zu Beginn der Messkampagne geringer sind als zum Ende der Messkampagne. Diese zunehmende Streuung ist auf den unterschiedlich starken Befall der Blätter zurückzuführen. In den Boxplots in **Abbildung 22** sind die Tage, an denen die Proben bewässert wurden blau dargestellt. Anhand dieser Auswertung lässt sich kein eindeutiger Einfluss der Bewässerung auf die Fluoreszenzindizes oder Reflektionswerte erkennen. Die oberen Ausreißer der nicht inokulierten Kontrollgruppe in **(c)** stammen alle von der Probe, die während der gesamten Messkampagne nicht bewässert wurde. Die befallene Probe, welche ebenfalls nicht bewässert wurde, zeigt kein solch ausreißendes Verhalten. Die Beobachtung, der geringen Schwankungen der ChlF-Verhältnisse über die Messkampagne in **Abbildung 21 (c)** spiegelt sich auch in **Abbildung 22 (c)** wieder. Die Werte nach einer Anregung von 532 nm unterliegen zwar einer relativ hohen Streuung, diese ist aber über die Zeit im Vergleich zu den anderen Abbildungen konstant. Die Proben der beiden Inokulationsgruppen lassen sich ab 8 dpi anhand der vorgestellten Auswertungen für die Anregungswellenlängen 355 und 532 nm, sowie der Messung bei allen Wellenlängen des Lasermoduls 1 unterscheiden.

4.4 Statistische Messungen zur Validierung der Methodik

4.4.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen des Mehltaubefalls

In diesem Versuch wurden Aufnahmen von einem gesunden Riesling-Blatt und einem befallenen Blatt auf Ober- und Unterseite mit Hilfe eines USB-Lichtmikroskops gemacht. Ausschnitte dieser Aufnahmen sind in **Abbildung 23** dargestellt.

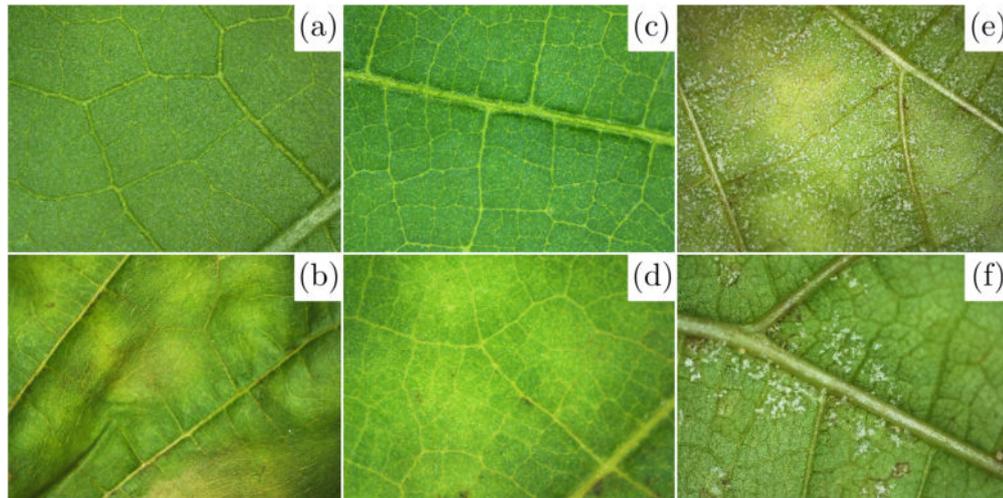


Abbildung 23. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Riesling-Blättern. (a): Fernaufnahme gesund von oben. (b): Fernaufnahme befallen von oben. (c): Nahaufnahme gesund von oben. (d): Nahaufnahme befallen von oben. (e): Nahaufnahme starker Befall von unten. (f): Nahaufnahme leichter Befall von unten.

Abbildung 23 (a) zeigt ein gesundes Blatt auf der Oberseite ohne einen Mehltaubefall. Zu sehen ist die Epidermis in einem satten und gleichmäßigen Grünton unterhalb einer wenig ausgebildeten Kutikula. Zu erkennen sind Leitbündel und ebenso vereinzelte Blattadern. Diese Komponenten sind in der Nahaufnahme des gesunden Blattes in (c) ebenfalls zu sehen. In dieser Aufnahme lassen sich die feineren Blattadern und außerdem leichte Zellstrukturen erkennen. Die Bilder (b) und (c) zeigen die Oberseite eines befallenen Blattes. Deutlich auszumachen ist hier das geschwundene satte Grün, die Lamina wirkt gelblich, wie auch die Blattadern. Diese Nekrotisierung ist auf einen verminderten Chlorophyllgehalt zurückzuführen, welcher sich auch in der Fluoreszenz widerspiegelt.²⁴ Das Bild (e) zeigt einen starken Befall von falschem Mehltau auf der Blattunterseite, (f) einen leichten Befall. Durch den Vergleich der Ober- und Unterseite lässt sich feststellen, dass die Mykose sowohl auf der Blattunter- als auch auf der Blattoberseite zu einer Verfärbung des Gewebes führt. Auf der Unterseite zeichnet sich der Befall durch die Sporenbildung auf der Epidermis ab. Diese wird in **Unterunterabschnitt 4.4.2** weiter untersucht. Im Vergleich der Aufnahmen (e) und (f) lässt sich erkennen, dass ein leichter Befall in (f) zu einer weniger ausgeprägten Verfärbung führt und die Sporenbildung an Mittel- und Seitenrippen des Blattes stattfindet. Ein starker Befall in (e) zeichnet sich durch eine höhere Nekrotisierung der Lamina und das Verteilen des Pilzgewebes auf dieser ab.

4.4.2 Aufnahmen des Mehltreibbefalls mit dem Rasterelektronenmikroskop

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des Rasterelektronenmikroskops (REM) vorgestellt. Mit diesem wurden Aufnahmen der Blattunterseite eines gesunden und eines befallenen Riesling-Blattes gemacht. Die Aufnahmen sind in **Abbildung 24** dargestellt.

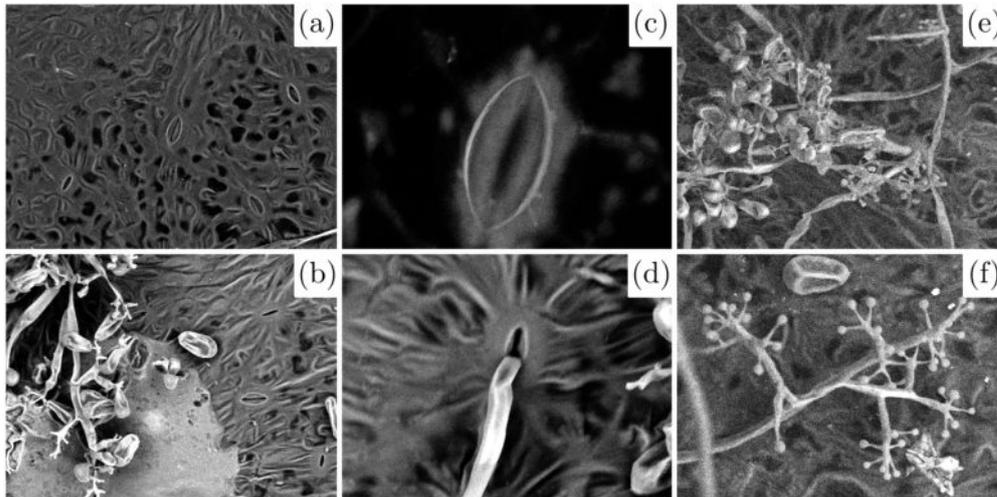


Abbildung 24. REM-Aufnahmen der Unterseiten eines gesunden und eines befallenen Riesling-Blattes. **(a):** Übersicht einer gesunden Blattoberfläche bei 500-facher Vergrößerung. **(b):** Übersicht einer befallenen Blattoberfläche bei 500-facher Vergrößerung. **(c):** Nahaufnahme eines gesunden stomatären Komplexes bei 2500-facher Vergrößerung. **(d):** Nahaufnahme eines befallenen stomatären Komplexes bei 1300-facher Vergrößerung. **(e)** und **(f):** Sporangienträger auf Blattoberfläche bei 500-facher Vergrößerung.

Das Bild in **Abbildung 24 (a)** zeigt die Unterseite eines gesunden Blattes. Zu erkennen sind Zellstrukturen der Epidermis und Stomata. Eine Nahaufnahme eines stomatären Komplexes zeigt die Nahaufnahme in **(c)**. Zu erkennen ist eine geschlossene Spaltöffnung, welche sich mit ihren Schließzellen in der Epidermis befindet.⁴⁰ Die Bilder in **(b)** und **(d)** zeigen analog zu **(a)** und **(c)** eine Übersicht über die Epidermis und eine Nahaufnahme eines stomatären Komplexes, jedoch eines befallenen Blattes. In **(b)** lässt sich ein Sporangienträger auf der Blattoberfläche und eine bereits abgeschnürte Sporangie in der Bildmitte neben Stomata erkennen. In der Aufnahme **(d)** lässt sich der Ursprung dieses Sporangienträgers als eine Hyphe erkennen, welche aus einer geschlossenen Spaltöffnung herausdringt. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass sich der Pilz im asexuellen Lebenszyklus befindet und bereits eine epidemische Ausbreitung der Pilzhyphen im interzellulären Raum des Weinblattes stattgefunden hat.^{40,41} Es ist denkbar, dass die helle, homogene Struktur auf der Epidermis im linken, unteren Teil des Bildes die Ausbildung einer Cuticula als Reaktion der Pflanze gegen das Pathogen ist. In **(e)** ist ein weiterer Sporangienträger mit heranreifenden Sporangien zu sehen, welcher aus einer Stoma wächst. Bild **(f)** zeigt junge Sporangien an den Astenden der Sporangienträger sowie eine ausgereifte und abgeschnürte Sporangie oben im Bild.

4.4.3 Fluoreszenzmessungen der Blattunterseite

In den letzten beiden Abschnitten **Unterunterabschnitt 4.4.2** und **Unterunterabschnitt 4.4.1** wurde in lichtmikroskopischen und rasterelektronischen Aufnahmen gezeigt, dass sich ein Befall mit *Plasmopara viticola* durch eine Verfärbung der Lamina auf Blattober- und Blattunterseite, sowie durch die Ausbildung von Sporangienträgern auf der Blattunterseite zeigt. In **Unterabschnitt 4.2** konnte diese Verfärbung durch den Chlorophyllabbau bei Befall bereits mit LIF-Messungen untersucht werden. In anderen Arbeiten wurde bereits untersucht, dass Pilzmyzel bei der Anregung im UV-Bereich zur Fluoreszenz im blauen Bereich neigt.^{29,42} In diesem Fall sollte das Fluoreszenzsignal in F_{Blau} der Blattunterseite dem der Blattoberseite überwiegen. In diesem Versuch wurden analog zu **Unterabschnitt 4.2** LIF-Scanmessungen von einem gesunden und einem befallenen Riesling-Blatt mit den Fluoreszenzanregungswellenlängen 355 und 532 nm durchgeführt. Die Spektren dieser Messungen sind in **Abbildung 25** aufgetragen.

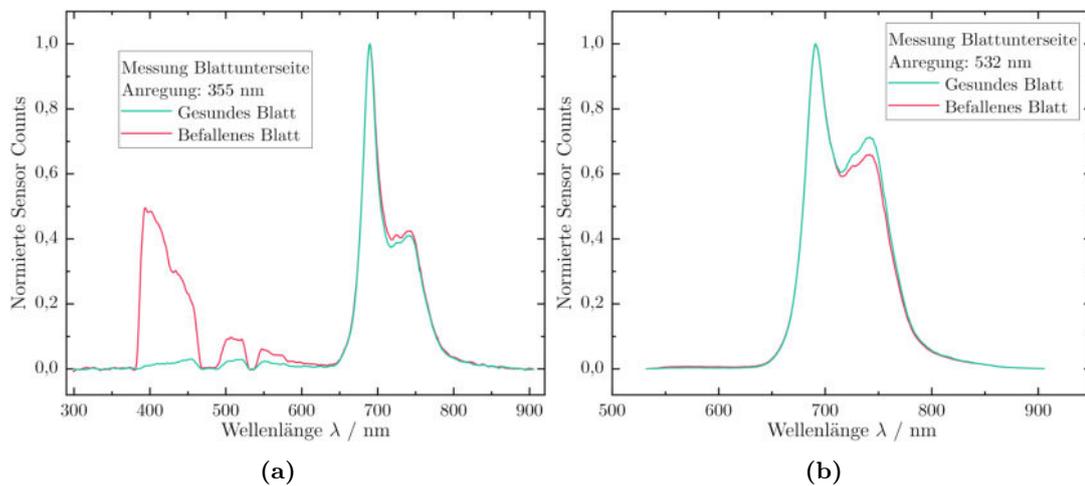


Abbildung 25. LIF-Spektren der Scanmessungen auf der Unterseite von Riesling-Blättern mit starkem Befall und ohne sichtbare Symptome bei den Anregungswellenlängen von 355 und 532 nm. Die Sensorcounts wurden auf 1 normiert.

Die Ergebnisse der LIF-Messungen an der Blattunterseite in **Abbildung 25 (a)** zeigen für das befallene Blatt eine deutlich höhere Emission der Fluoreszenzbande in F_{Blau} im Vergleich zum gesunden Blatt. Für die Messung des gesunden Blattes wurde ein BFRR_UV-Index von 56.55×10^{-3} bestimmt, welcher leicht geringer als der Wert der Oberseite des gesunden Blattes ist. Der BFRR_UV-Index der Unterseite des befallenen Blattes erreicht einen Wert von 1042.28×10^{-3} , womit die Fläche des Integrals F_{Blau} die des Integrals F_{Rot2} übersteigt. Das Signal der BGF auf der Blattunterseite beträgt damit das 2.7-fache der Oberseite. Da sich auf der Blattunterseite Sporangienträger befinden, ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte Fluoreszenz auf der Blattunterseite im blauen Bereich durch eine erhöhte Synthese von Phytoalexinen der Pflanze (Intensitätsmaximum von Stilbenen bei 400 nm^{36,37}) und vom Pilzmyzel, bzw. der Sporangienträger hervorgerufen wird. In den kommenden beiden Abschnitten werden Fluoreszenzmessungen an der Sporan-

giensuspension vorgestellt, um die Emission der Sporangiensuspension zu untersuchen.

Die LIF-Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm zeigen für das befallene Blatt eine geringe Emission im Fluoreszenzband F_{Rot2} . Das ChlF-Verhältnis für das befallene Blatt übersteigt mit einem Wert von 80.90×10^{-2} das ChlF-Verhältnis des gesunden Blattes bei einem Wert von 75.43×10^{-2} um 7.3%. Die Beobachtung eines höheren ChlF-Verhältnisses des befallenen Blattes deckt sich mit den Ergebnissen aus **Unterabschnitt 4.2**.

4.4.4 Anregungsemissionsspektren der Sporangiensuspension im Fluoreszenzspektrometer

Zur Untersuchung der Emissionseigenschaften der sich ausbildenden Sporangienträger auf der Unterseite befallener Blätter wurden in diesem Abschnitt mit einem Fluoreszenzspektrometer Anregungsemissionsspektren der Sporangiensuspension (4×10^5 Sporangien/mL) aufgenommen, welche zur Inokulation der Topfreben verwendet wurde. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 26** dargestellt.

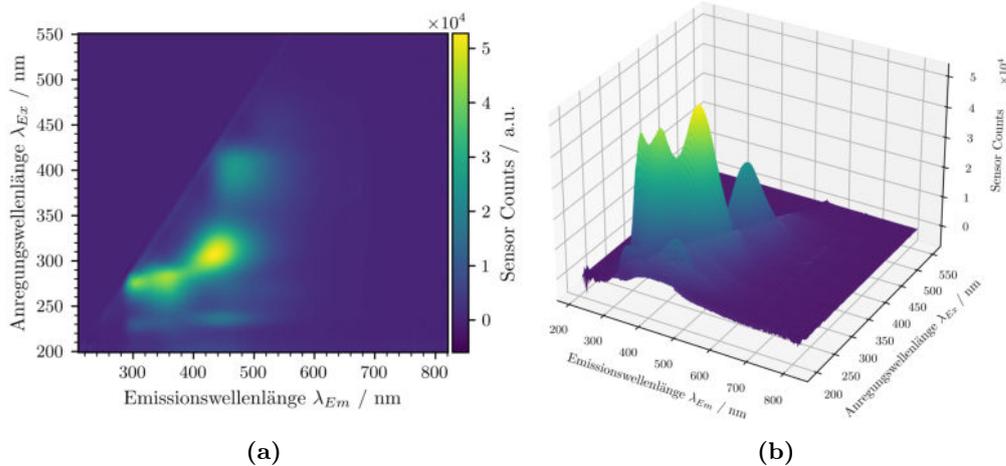


Abbildung 26. Anregungsemissionsspektren der Sporangiensuspension gemessen am Fluoreszenzspektrometer. (a): Zweidimensionale Darstellung, (b): Dreidimensionale Darstellung.

In den Anregungsemissionsspektren in **Abbildung 26 (a)** und **(b)** lässt sich erkennen, dass die Sporangiensuspension generell im blauen Bereich, unterhalb von 500 nm emittiert. Damit wirkt sich ein Befall von *Plasmopara viticola* nicht direkt auf die Intensität der ChlF in den Fluoreszenzbanden F_{Rot1} und F_{Rot2} aus. Maximale Emissionssignale um 450 nm liefert die Sporangiensuspension durch eine Anregung um 310 nm. Ebenso entsteht ein breites Fluoreszenzsignal im Bereich von 300 bis 380 nm bei einer Anregung um 280 nm. Die Spektren besitzen keine Emissionsmaxima bei 400 nm.

4.4.5 LIF-Messung der Sporangiensuspension am vinoLAS-Labormuster

Zur Validierung der Ergebnisse aus **Unterunterabschnitt 4.4.4** und zur Interpretation dieser im Kontext der Messungen am vinoLAS-Demonstrator, wurden LIF-Messungen der Sporangiensuspension am Demonstrator durchgeführt. Bei den Messungen handelte es sich nicht wie bisher um Scanmessungen, bei denen der Scanspiegel bewegt wurde, sondern um statische Punktmessungen an einer Küvette, die im Messpunkt platziert war. Das Spektrum der LIF-Punktmessung bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm ist in **Abbildung 27** dargestellt.

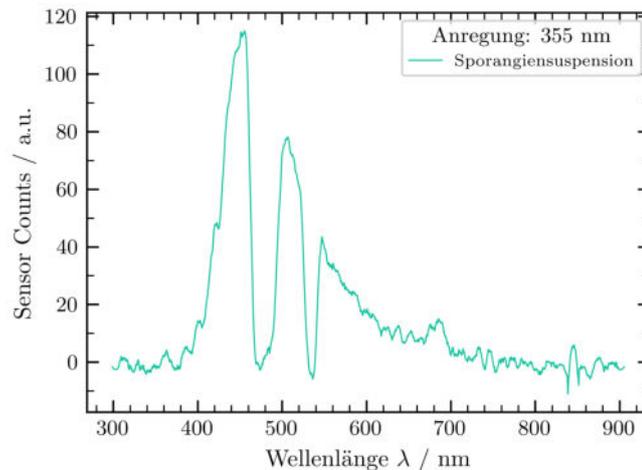


Abbildung 27. LIF-Spektrum der *Plasmopara Viticola*-Sporangiensuspension. Gemessen am vinoLAS-Labormuster bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm.

Das LIF-Spektrum der Sporangiensuspension in **Abbildung 27** zeigt generell ein schwaches Signal mit deutlich sichtbarem Rauschanteil. Diese Beobachtung deckt sich mit den geringen Intensitäten der BGF, verglichen mit der ChlF aus bisher vorgestellten Messungen der Blattoberseite. Gut zu erkennen sind in diesem Spektrum die Intensitätseinbrüche um 473 und 532 nm, welche durch den Einsatz der Notchfilter im Detektionsmodul entstanden sind. Das Spektrum besetzt ein Maximum von 115 Sensorcounts bei einer Wellenlänge von 456 nm. Durch die Einordnung dieses Ergebnisses in die Anregungsemissionsspektren aus **Unterunterabschnitt 4.4.4** lässt sich schließen, dass bei einer Fluoreszenzanregung bei der Wellenlänge 355 nm zwar der intensivitätsstärkste Fluoreszenzübergang der Sporangien angeregt wird, die Anregung aber nicht im optimalen Bereich liegt. Die Fluoreszenz des pathogenen Pilzes geht von dessen Keimschläuchen, Appressorien und Hyphen aus.²⁹ Da die BGF in **Abbildung 25** aus einem Emissionsmaximum bei 394 nm und einem weiteren Signal als Schulter bei 440 nm besteht, ist es wahrscheinlich, dass das Maximum durch die Emission von Stilbenen und das Schulterersignal durch die Emission Pilzbestandteile entsteht.^{36,37}

4.4.6 Fluoreszenzunterschiede auf einem einzelnen Blatt

In diesem Versuch wurden mehrere LIF-Scanmessungen auf einem gesunden Riesling-Blatt nebeneinander durchgeführt und anschließend die Scanzeile durch die Bewegung eines linearen Verschiebetisches verschoben. Aus den Spektren der Fluoreszenzanregung bei 355 und 532 nm wurden der BFRR_UV-Index und das ChlF-Verhältnis gebildet und in **Abbildung 28** dargestellt.

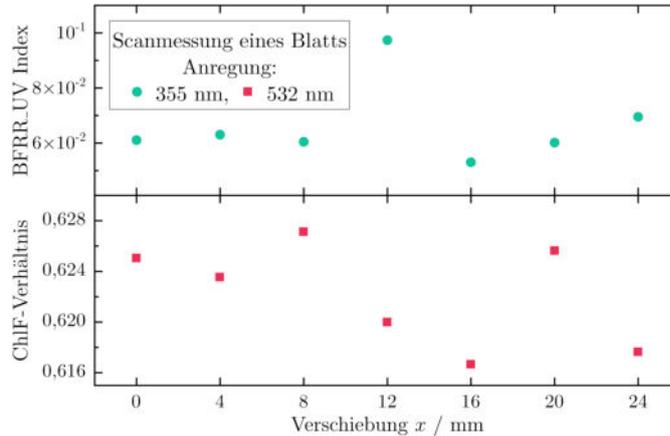


Abbildung 28. BFRR_UV-Index und ChlF-Verhältnisse als Ergebnis der LIF-Scanmessungen und anschließender Verschiebung x des Scanbereichs um 4 mm über ein gesundes Riesling-Blatt. Fluoreszenzanregung bei den Wellenlängen 355 und 532 nm.

Bei Betrachtung der Werte des BFRR_UV-Indexes und des ChlF-Verhältnisses in **Abbildung 28** fällt auf, dass die Änderung dieser Indizes keinem offensichtlichen Trend folgt, es also keinen Gradienten der BGF oder der ChlF entlang des Blattes gibt. Die Werte des BFRR_UV-Indexes liegen im Bereich von 53.04×10^{-3} bis 97.39×10^{-3} wobei das Maximum durch einen ausreißenden Wert bestimmt wird. Der BFRR_UV-Index unterliegt einer Standardabweichung von 14.50×10^{-3} . Die Werte des ChlF-Verhältnisses liegen im Bereich von 61.67×10^{-2} bis 62.72×10^{-2} . Die Standardabweichung dieses Verhältnisses liegt bei 0.41×10^{-2} .

4.4.7 Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz auf Weinblättern

Während der Messkampagne wurde beobachtet, dass auf der Messplatte fixierte Weinblätter nie mit der gesamten Blattfläche vollständig parallel zur Messplatte ausgerichtet waren und es an einigen Stellen zu Wölbungen kam, wodurch das Blatt nicht vollständig orthogonal zur Anregung/Detektion ausgerichtet war. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit dem Einfluss der Winkelabhängigkeit der laserinduzierten Fluoreszenz auf der Blattoberfläche. Dazu wurden LIF-Punktmessungen auf einem Riesling-Blatt durchgeführt, dessen Winkel zum Anregungsstrahl durch das Betätigen eines vertikal positionierten Rotationstischs verändert wurde. Die Ergebnisse der Messungen mit den Anregungswellenlängen 355 und 532 nm sind in **Abbildung 29** aufgetragen.

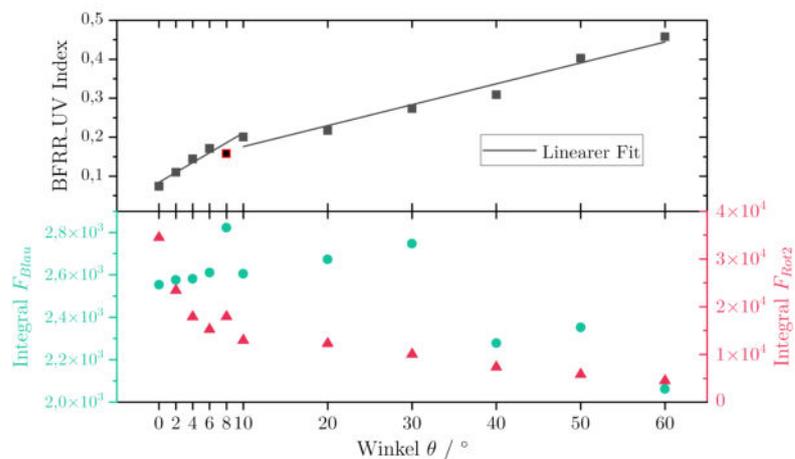


Abbildung 29. Fluoreszenzbanden (Integrale) F_{Blau} und F_{Rot2} und daraus bestimmter BFRR_UV-Index mit zwei linearen Anpassungen der LIF-Punktmessungen bei variablem Winkel θ . Der rot umrandete Datenpunkt stellt einen Ausreißer dar.

Die integrierten Sensorcounts der Fluoreszenzbande F_{Blau} folgen von einem Winkel θ von 0° bis 30° annähernd linear einem steigenden Trend und fällt von 40° bis 60° auf niedrigere Werte. Die Fluoreszenzbande F_{Rot2} fällt stetig mit einem exponentiellen Verlauf. Die Integrale beider Fluoreszenzbanden zeigen bei 8° einen Ausreißer. Der aus den Fluoreszenzbanden bestimmte BFRR_UV-Index besitzt Werte im Bereich von 74.02×10^{-3} bis 475.88×10^{-3} und zeigt im Bereich von 0 bis 10° eine erhöhte und ab 10° eine leichtere Steigung. Durch eine lineare Regression konnte die Steigung im Bereich von 0 bis 10° auf $12.67 \times 10^{-3} / ^\circ$ und ab 10° auf $5.37 \times 10^{-3} / ^\circ$ bestimmt werden. Für die Ausrichtung des Riesling-Blattes wird ein maximaler Winkel von 5° angenommen. Um den Einfluss des Winkels θ auf die Messung zu bestimmen, wird mit Hilfe der linearen Regression zwischen 0 und 10° der Wert des BFRR_UV-Indexes bei 5° berechnet. Damit wird ein maximaler Fehler von 147.68×10^{-3} erhalten.

4.4.8 Fluoreszenzverhalten bei wiederholter Anregung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Messungen bei wiederholter Anregung vorgestellt. Dabei wurden auf der gleichen Stelle LIF-Punktmessungen zehnfach wiederholt. Die integrierten Sensorcounts der Fluoreszenzbanden F_{Blau} und F_{Rot2} , sowie der BFRR_UV Index sind in **Abbildung 30** dargestellt.

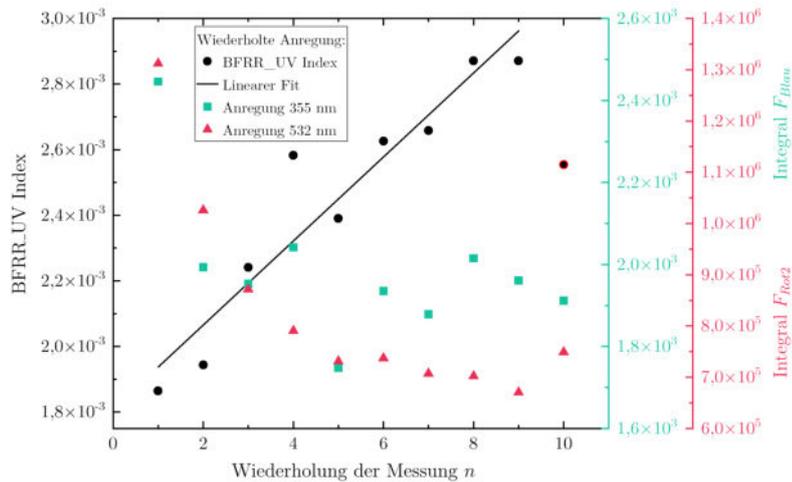


Abbildung 30. Auftragung der Fluoreszenzbanden F_{Blau} und F_{Rot2} aus den Messungen über zehn wiederholte Anregungen an gleicher Stelle und des daraus bestimmten und linear angepassten BFRR_UV-Indexes. Der rot umrandete Datenpunkt stellt einen Ausreißer dar.

Bei Betrachtung der Verläufe von F_{Blau} und F_{Rot2} in **Abbildung 30** fällt auf, dass die Verläufe dieser Integrale in erster Näherung mit steigender Anzahl an Wiederholungen n einer exponentiellen Abnahme ähneln. Diese Abnahme der Fluoreszenzintensität wird durch den Kautsky-Effekt beschrieben und dadurch begründet, dass im Photosynthesesystem produzierte Energie in der Elektronentransportkette nicht umgehend abgeleitet werden kann und überschüssige Energie als Fluoreszenz emittiert wird.⁴³ Die aus F_{Blau} und F_{Rot2} gebildeten BFRR_UV-Indizes steigen mit zunehmender Wiederholung n an. Durch eine lineare Anpassung konnte ein Einfluss der wiederholten Anregung von $0,13 \times 10^{-3}$ pro Wiederholung auf den BFRR_UV-Index ermittelt werden.

4.4.9 Bestimmung des Einflusses von Messmarkierungen auf der Blattoberfläche

Für die Messung der Riesling-Blätter während der Messkampagne wurden diese mit zwei Strichen eines DVD-Markers markiert, um den Scanbereich für die LIF-Messung reproduzierbar festzulegen. Durch das Verrutschen des Blattes ist es nicht ausgeschlossen, dass Markierungen während der Messkampagne in den Scanbereich geraten sind. Dieser Abschnitt soll sich mit dem Einfluss dieser Markierungen auf die Fluoreszenz der Blätter beschäftigen.

Abschattung des Blattes durch Messmarkierungen Für diesen Teilabschnitt soll die Abschattung der laserinduzierten Fluoreszenz eines gesunden Riesling-Blattes durch die Messmarkierung untersucht werden. Dafür wurden Messungen durchgeführt, bei der absichtlich zwei Markierungen im Scanbereich platziert wurden. Zum Vergleich wurde vorher eine Scanmessung an derselben Stelle des Blattes ohne Markierung durchgeführt.

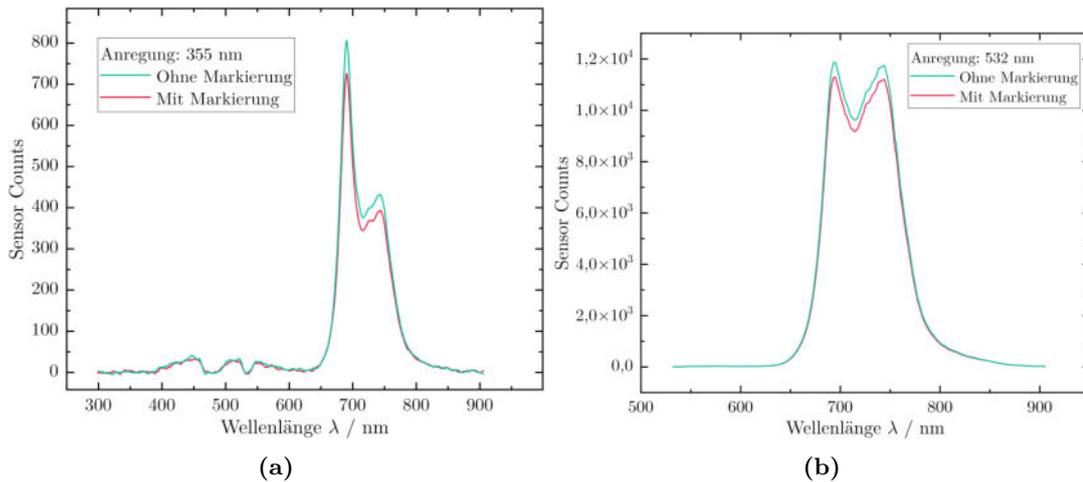


Abbildung 31. Spektren der LIF-Scanmessungen auf der Blattoberseite mit und ohne vorsätzlich platzierten Markierungen im Scanbereich. (a): Fluoreszenzanregung bei 355 nm, (b): Anregung bei 532 nm.

Bei Betrachtung der Fluoreszenzspektren in **Abbildung 31 (a)** ist zu erkennen dass zu keiner signifikanten Änderung in der Zahl der Sensorcounts der BGF durch die Abschattung der Markierung kommt. Eine Änderung des Signals liegt im Rauschen des Detektors. Die vom Blatt emittierte ChlF wird hingegen sichtbar durch die Markierungen abgeschattet. Es ist denkbar, dass die Inhaltsstoffe des DVD-Markers in diesem Bereich absorbieren. Aus dem Spektrum ohne Markierung wurde ein BFRR_UV-Index von 70.36×10^{-3} errechnet. Der Index für das markierte Blatt beträgt 65.85×10^{-3} , womit sich eine relative Abweichung von -6.8% durch die Markierung ergibt.

Das Spektrum der ChlF nach der Anregung mit 532 nm in **Abbildung 31 (b)** zeigt analog zur ChlF in (a), dass die gesamte Intensität der ChlF durch den Marker verringert wird. Diese Beobachtung wird durch das ChlF-Verhältnis bestätigt. Die Bestimmung des ChlF-Verhältnisses ohne Markierung ergibt einen Wert von 57.04×10^{-3} . Mit Markierung wird ein Wert von 56.74×10^{-3} erhalten. Daraus ergibt sich eine relative Abweichung von -0.5% . Auch wenn die Intensität der ChlF-Signale sinkt, ändert sich deren Verhältnis nur geringfügig. Daraus kann entnommen werden, dass sich eine unbeabsichtigte Messung der Markierung auf dem Blatt während der Messkampagne vor allem auf den BFRR_UV-Index auswirkt.

Fluoreszenz der Messmarkierung In diesem Teilabschnitt soll untersucht werden, ob von den Inhaltsstoffen des DVD-Markers für die Messmarkierungen bei Anregung durch einen Laser selbst eine Fluoreszenz ausgeht. Für die Messung

wurde der DVD-Marker auf eine mattschwarze Stahlplatte (Referenzplatte) aufgetragen und Fluoreszenzspektren in einer LIF-Punktmessung bei allen verfügbaren Wellenlängen des Demonstrators aufgenommen.

Die Auswertung der aufgenommenen Spektren ergibt, dass keine mit dem Demonstrator detektierbare Fluoreszenz durch die Inhaltsstoffe des Markers emittiert wurde. Es existiert nach Bestrahlung der Markersubstanz durch die verschiedenen Laserwellenlängen kein signifikantes Signal, welches über das Grundrauschen des Spektrometers hinaus geht. Da das Spektrum nur Rauschen darstellt, wird auf eine Abbildung an dieser Stelle verzichtet.

4.4.10 Distanzabhängigkeit der laserinduzierten Fluoreszenz

Die Fokussierung zur Einkopplung des Fluoreszenzlichts in den Lichtwellenleiter im Detektionssystem des vinoLAS-Demonstrators wurde auf eine Entfernung des zu messenden Blattes zum Scanspiegel von 160 cm optimiert. Da die Entfernung zu den Blättern einer Weinrebe bei einer Feldmessung im Weinberg jedoch variieren kann, wird in diesem Teilabschnitt die Distanzabhängigkeit der laserinduzierten Fluoreszenz untersucht. Außerdem soll abgeschätzt werden, in welchem Maße die Distanz zur Probe einen Einfluss auf die Ergebnisse der Messkampagne hat. Es wurden LIF-Punktmessungen an einem gesunden Blatt durchgeführt und die Distanz der Blattoberfläche zum Scanspiegel nach jeder Messung um 20 cm verringert. Die aus den Spektren errechneten BFRR_UV-Indizes der Fluoreszenz-anregung mit 355 nm sind in **Abbildung 32** dargestellt.

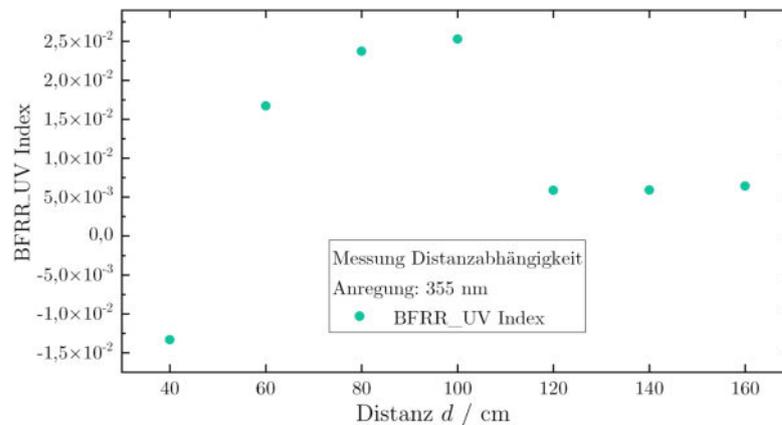


Abbildung 32. Auftragung der Werte des BFRR_UV-Indexes in Abhängigkeit zur Distanz d der Probe vom Scanspiegel.

Bei Betrachtung des Verlaufs des BFRR_UV-Indexes über die Distanz d in **Abbildung 32** ist ein logarithmischer Anstieg der Werte von -13.31×10^{-3} bis 25.28×10^{-3} im Distanzbereich d von 40 bis 100 cm zu erkennen. Die Werte bei den Distanzen d von 120 bis 160 cm liegen mit einer Standardabweichung von 0.29×10^{-3} um den Mittelwert 6.06×10^{-3} und zeigen eine deutliche geringe Streuung. Die Abweichungen des BFRR_UV-Indexes mit der Distanz d entstehen vermutlich durch Abbildungsfehler auf die Fasereinkopplung und eine Defokussierung durch den sich ändernden Abstand. Da es bei der Fixierung des zu messenden Blattes auf der Messplatte zu Wölbungen der Blattoberfläche kommen konnte und sich das Fotostativ, auf dem die Messplatte montiert war während der Messkampagne verschoben haben könnte, wird eine Distanzunsicherheit von ± 3 cm angenommen. Aufgrund mangelnder Daten in diesem Messbereich wird die Standardabweichung im Bereich 120 bis 160 cm als Einfluss der Distanz auf den BFRR_UV-Index übernommen.

4.4.11 Auswirkungen des Messzeitpunktes zu verschiedenen Tageszeiten

Die Messungen der Messkampagne fanden täglich in der Regel von 9 bis 17 Uhr statt. Wegen der Durchführung weiterer Messungen kam es gelegentlich zu Abweichungen von ± 2 Stunden. Die Topfreben wurden täglich in der gleichen Reihenfolge gemessen. Aufgrund des Messaufwands verteilten sich die Messungen jedoch über den gesamten Tag. In diesem Teilabschnitt soll der Einfluss der Tageszeit auf den BFRR_UV-Index untersucht werden. Dazu wurden LIF-Scanmessungen um 9, 13 und 17 Uhr an einem gesunden und einem befallenen Blatt von Topfreben der Messkampagne durchgeführt. Die Werte für die ermittelten BFRR_UV-Indizes nach einer Fluoreszenzanregung von 355 nm sind in **Abbildung 33** dargestellt.

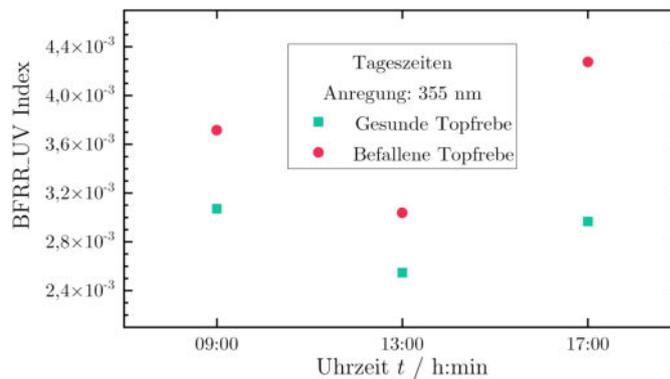


Abbildung 33. Werte des BFRR_UV-Indexes einer gesunden und einer befallenen Topfrebe zu verschiedenen Tageszeiten. Die Messungen fanden um 9, 13 und 17 Uhr statt.

Bei dem Vergleich der BFRR_UV-Indizes des gesunden Blattes in **Abbildung 33** mit denen des kranken Blattes, fällt auf, dass vom befallenen Blatt generell höhere Werte als vom gesunden Blatt ausgehen. Diese Beobachtung bestätigt die Vergleiche zwischen gesunden und befallenen Proben aus den vorherigen Abschnitten. Die Werte des gesunden Blattes liegen mit einer Standardabweichung von $0,28 \times 10^{-3}$ um einen Mittelwert von $2,86 \times 10^{-3}$, während die Werte des befallenen Blattes mit einer Standardabweichung von $0,62 \times 10^{-3}$ um einen Mittelwert von $3,68 \times 10^{-3}$ liegen. Das befallene Blatt unterliegt somit einer doppelt so hohen Streuung im Vergleich zum gesunden Blatt, was auf einen größeren Anstieg der Werte zwischen 13 und 17 Uhr zurückzuführen ist.

4.4.12 Fluoreszenzunterschiede innerhalb einer Rebe

In der Messkampagne wurde für die regelmäßigen LIF-Messungen jeweils ein Blatt ein Blatt jeder Topfrebe ausgesucht, welches sich zur Fixierung möglichst auf Höhe und Messplatte befand und vom optischen Eindruck die Gesamtheit aller Blätter der jeweiligen Rebe repräsentierte. Es liegt nahe, dass vor allem befallene Reben (durch einen unterschiedlichen Grad des Befalls) verschiedene Fluoreszenzmuster zeigen. Zur Ermittlung der Unterschiede im BFRR_UV-Index von unterschiedliche

Blättern innerhalb einer Topfrebe, wurden LIF-Punktmessungen einer befallenen Rebe mit visuell mittelstarken Symptomen durchgeführt. Die ermittelten Werte nach einer Fluoreszenzanregung bei 355 nm sind in **Abbildung 34** abgebildet.

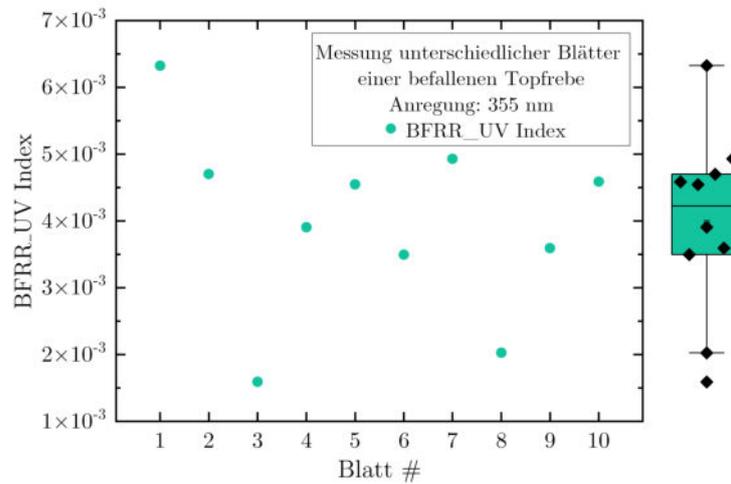


Abbildung 34. BFRR_UV-Indizes von zehn unterschiedlichen Blättern einer befallenen Topfrebe bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm.

Die Werte des BFRR_UV-Indexes der unterschiedlichen Blätter reichen von 1.59×10^{-3} bis 6.32×10^{-3} . Mit einer Standardabweichung von 1.40×10^{-3} erreichen die Werte eine hohe Streuung um den Mittelwert 3.97×10^{-3} im Vergleich zu ihren absoluten Beträgen.

4.4.13 Scanmessung einer Weinrebe

In **Unterunterabschnitt 4.4.12** wurde herausgestellt, dass es bei den LIF-Messungen verschiedener Blätter innerhalb einer befallenen Topfrebe durchaus zu signifikanten Unterschieden des BFRR_UV-Indexes kommen kann. In **Unterunterabschnitt 4.4.12** konnten anstatt Scanmessungen aufgrund der verschiedenen Größen der Blätter lediglich Punktmessungen durchgeführt werden. Zur Anwendung der Scanmessung und zur Untersuchung der Durchführbarkeit dieser bei Feldmessungen an Rebzeilen im Weinberg, wurde der Scanbereich des Demonstrators in der entwickelten Messsoftware angepasst und LIF-Scanmessungen an der gleichen, befallenen Topfrebe aus **Unterunterabschnitt 4.4.12** durchgeführt. Das Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm ist in **Abbildung 35** dargestellt.

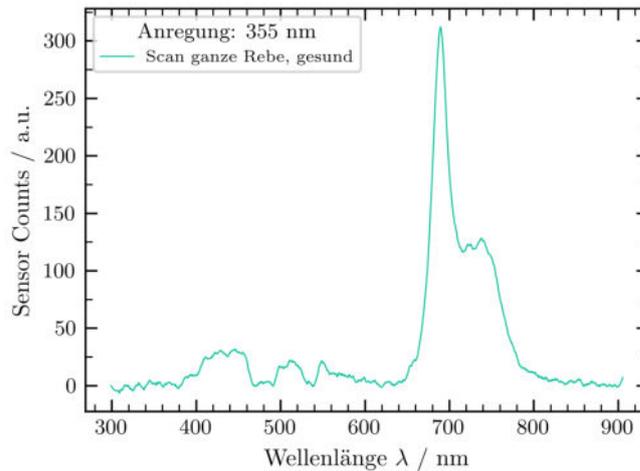


Abbildung 35. Spektrum der LIF-Scanmessung über eine gesamte Topfrebe im gesunden Zustand, Fluoreszenz-anregung bei 355 nm.

Das Emissionsspektrum in **Abbildung 35** zeigt analog zu den bisherigen Ergebnissen sowohl eine BGF, als auch eine ChlF. Anhand der Intensität der BGF lässt sich bereits erahnen, dass diese Probe (repräsentativ für Reben der Messkampagne) einem deutlich geringeren Befall unterliegt, als die Rebe mit starkem Befall aus **Abbildung 17** und **Abbildung 25**. Dies spiegelt sich auch im geringeren BFRR_UV-Index von 232.24×10^{-3} wieder. Im direkten Vergleich an der gleichen Rebe, beträgt dieser Wert jedoch ein Vielfaches vom Mittelwert von 3.97×10^{-3} des BFRR_UV-Indexes aus dem letzten Teilabschnitt (**Unterunterabschnitt 4.4.12**). Diese extreme Diskrepanz hängt wahrscheinlich mit dem Pflanzenmaterial zusammen, welches vom Laser abgescannt wurde. In **Unterunterabschnitt 4.4.12** wurde ausschließlich die Fluoreszenz von Blättern gemessen. Bei der Scanmessung über die ganze Rebe wurden auch Blattstiele und Stämme mitgemessen, welche aufgrund ihres höheren Anteils an Stützstrukturen einen größeren Gehalt an Ferulasäure besitzen. Ferulasäure ist an der Synthese von Lignin beteiligt und eine der wichtigsten emittierenden Substanzen der BGF.^{3,44} Bei der Scanmessung der Rebe wurde ein ChlF-Verhältnis von 72.39×10^{-2} erhalten. Dieser Wert liegt im Bereich der Ergebnisse aus **Abbildung 17** und **Abbildung 25**. Bei der Betrachtung von **Abbildung 35** ist weiterhin auffällig, dass das Emissionsspektrum in **Abbildung 35** deutlich verrauschter ist, als die Spektren aus **Abbildung 17** und **Abbildung 25**. Diese Beobachtung kann dadurch begründet werden, dass bei einem Scan über die ganze Rebe auch die Zwischenräume mitgemessen wurden, bei denen der Anregungslaser auf den mattschwarz lackierten Stahl im Hintergrund traf. Generell liefert diese Messmethode ein jedoch ein auswertbares Spektrum. Da der BFRR_UV-Index als Verhältnis gebildet wird, ist die Intensität nicht direkt ausschlaggebend für diese Auswertung, solange es das Emissionsspektrum ein verwertbares Signal-Rauschverhältnis liefert.

4.4.14 Feldmessungen im Weinberg

Als Abschluss der Messkampagne wurde der vinoLAS-Labordemonstrator auf einem Weinberg zwischen zwei Weinreben aufgebaut. Es wurden LIF-Scanmessungen in der oberen Hälfte einer Rebe bei Tageslicht und bei Nacht durchgeführt. Beispielhaft sind die Spektren einer Tagesmessung bei 355 nm und einer Nachtmessung bei 532 nm in **Abbildung 36** dargestellt.

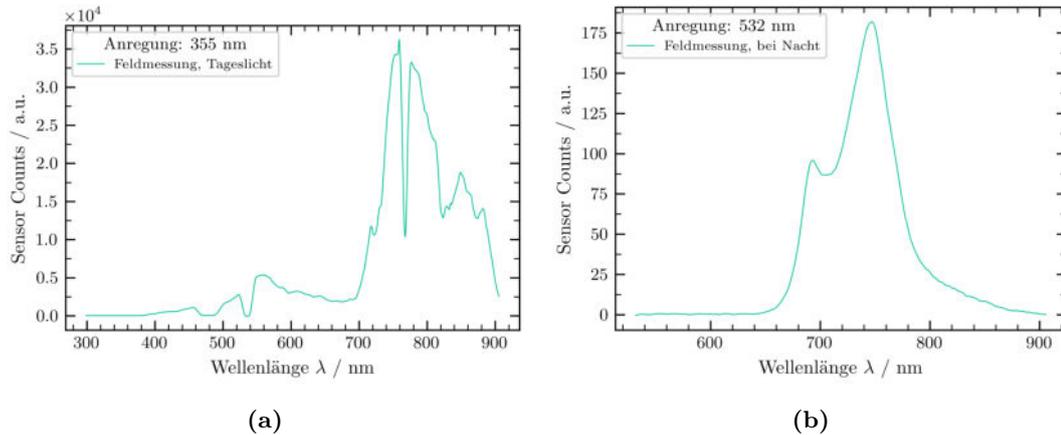


Abbildung 36. Spektren der LIF-Scanmessungen einer Rebzeile als Beispiel der Feldmessungen im Weinberg. **(a)**: Messung bei Tageslicht, Fluoreszenzanregung bei 355 nm. **(b)**: Messung bei Nacht, Fluoreszenzanregung bei 532 nm

Bei der Betrachtung des Spektrums bei Tageslicht in **Abbildung 36 (a)** sind grundsätzlich drei breite Banden zu erkennen. Die erste Bande mit einem Maximum von 557 nm kann der Lage des Strahlungsmaximums der Sonne (500 bis 600 nm) ausgehend durch eine Reflexion von der Blattoberfläche zugeordnet werden.²² Die zweite Bande im Bereich von 700 bis 830 nm wird der ChlF der Weinrebe zugeordnet. Da das ChlF-Signal allerdings in seiner Intensität mit maximal 36242 Sensorcounts ein Vielfaches der bisher mit dem gleichen Aufbau angeregten ChlF beträgt (3232 Counts in **Unterunterabschnitt 4.4.13**), handelt es sich höchstwahrscheinlich um Chlorophyll-Autofluoreszenz, welche durch die Sonne angeregt wurde.^{3,45}

Mit Hilfe der Parameter aus der Lasercharakterisierung in **Unterabschnitt 4.1**, soll eine Vergleichsrechnung zwischen der Laseranregung des Demonstrators und der Anregung durch Sonnenstrahlung durchgeführt werden. Als Ausgangswert soll die Dauerleistung des Lasers des Lasermoduls 1 bei der Wellenlänge 532 nm, gemessen am Messpunkt (160 cm Entfernung), dienen. Die Auswahl dieser Wellenlänge geht auf die Nähe der Lage des Strahlungsmaximums der Sonne im Spektrum zurück. Wenn angenommen wird, dass es sich bei dem zweidimensionalen Strahlprofil dieses Lasers um einen perfekten Kreis handelt, wird mit dem bestimmten Strahldurchmesser d von $3643 \mu\text{m}$ mit der Formel $A = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2$ eine Kreisfläche A von 10.42 mm^2 erhalten.⁴⁶ A beschreibt die durch den Laser beleuchtete Fläche auf dem Weinblatt. Die Dauerleistung dieser Anregungswellenlänge wurde mit Hilfe eines Leistungsmessgeräts auf 22.85 mW bestimmt. Die Bestrahlungsstärke E des

Lasers kann damit auf 2.19 W m^{-2} berechnet werden. Die Solarkonstante der Sonne beschreibt die Leistung pro Fläche der Sonne, die auf die Erde gelangt. Sie beträgt 1.37 kW m^{-2} und ist damit um den Faktor 626 größer als die Bestrahlungsstärke E des Lasers bei 532 nm .²² Der Ursprung der Bande im Bereich von 830 bis 900 nm des Spektrums in **(a)** ist unbekannt.

Im Emissionsspektrum der Nachtmessung in **Abbildung 36 (b)** sind die beiden Banden F_{Rot1} und F_{Rot2} der ChlF zu erkennen. Es fällt auf, dass die Lage der ChlF zu höheren Wellenlängen verschoben ist. Ein möglicher Grund ist, dass es sich bei der unbekanntem Weinsorte bei der Feldmessung um eine andere Sorte als den Riesling handelte, welche aufgrund zum Riesling verschiedener pflanzenphysiologischer Eigenschaften eine andere Umgebung für die Fluoreszenz bietet. Die Intensität des ChlF-Signals in **(b)** ist deutlich geringer als bei der Scanmessung der Rebe in **Unterunterabschnitt 4.4.13**, jedoch war eine Fluoreszenzanregung und Detektion von ChlF im im Weinberg bei Nacht möglich.

4.4.15 Bestimmung des Zustandes von unbekanntem Proben

Neben den 20 Topfreben, welche aus einer Gruppe von zehn gesunden und einer Gruppe von zehn inokulierten Reben bestanden, existierten zehn weitere Topfreben, dessen Zustand der experimentierenden Person unbekannt waren. Die Hälfte dieser Unbekannten Reben wurde von Kolleg*innen zum gleichen Zeitpunkt wie die bekannten Proben inokuliert. Zusätzlich zu den Messungen der Messkampagne an den 20 bekannten Topfreben, wurde die selbe Messroutine an den unbekanntem Proben bei 2, 9 und 14 dpi durchgeführt. Anhand der gesammelten Daten der bekannten Proben, sollte eine Auswertung stattfinden, die den Zustand der unbekanntem Proben vorhersagt. Die Auswertung wurde anhand der Anregungswellenlängen 355 und 532 nm durchgeführt. Je nach Anregungswellenlänge wurden analog zu den bisherigen Auswertungen der BFRR_UV-Index, bzw. das ChlF-Verhältnis gebildet. Die Werte dieser Indizes wurden über den gesamten dpi-Bereich der Messkampagne einer linearen Regression unterzogen. Ein Beispiel dieser Auswertung anhand des ChlF-Verhältnisses nach einer Fluoreszenzanregung von 532 nm für eine befallene Probe ist in **Abbildung 37** dargestellt.

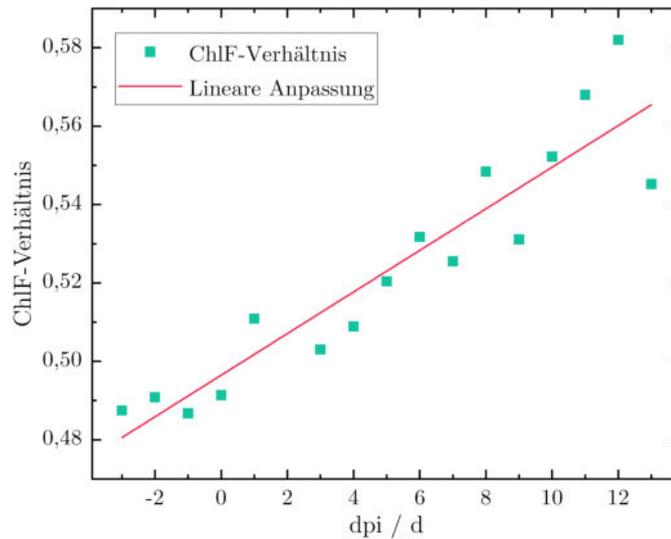


Abbildung 37. Auftragung der ChlF-Verhältnisse aus LIF-Scanmessungen bei 532 nm eines Blattes einer befallenen Topfrebe der Messkampagne über die dpi (days post inoculation). Die Werte wurden mit einer linearen Regression versehen.

Die Steigung der linearen Regression der ChlF-Verhältnisse in **Abbildung 37** als Maß für die Entwicklung der Indizes über die dpi genutzt. Sie beträgt in diesem Beispiel $0.53 \times 10^{-2}/d$. Auf die gleiche Weise wurden die Steigungen beider Indizes aller Proben der Messkampagne bestimmt. Pro Index wurde für die gesunden und befallenen Proben jeweils ein Mittelwert der Steigung gebildet. Der Mittelwert dieser beiden Mittelwerte pro Index galt als Schwellwert, ab dem eine unbekannte Probe als befallen oder gesund definiert wurde. Da die Messungen der Unbekannten bei 2 dpi fehlerhaft waren, für die zwischen den Werten der verbleibenden Indizes bei 9 und 14 dpi ebenfalls eine Steigung bestimmt. Diese Steigung der Unbekannten wurde mit dem zuvor bestimmten Schwellwert verglichen und dadurch der Zustand der Probe prognostiziert. Erst nach Ende der Auswertung wurden die tatsächlichen Zustände der zehn unbekanntenen Proben verkündet und mit den Prognosen verglichen. Bei der Auswertung des BFRR_UV-Indexes nach einer Fluoreszenzanregung bei 355 nm mit der beschriebenen Methode konnten 90 % der Zustände der Unbekannten korrekt bestimmt werden. Bei der Auswertung über das ChlF-Verhältnis konnten 50 % korrekt bestimmt werden.

5 Diskussion

In **Abschnitt 4** wurden die Ergebnisse dieser Arbeit aus der Charakterisierung des Lasersystems, der Messkampagne und den weiteren, statistischen Messungen vorgestellt. In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse nun diskutiert werden.

Bei der Bestimmung der Strahlprofile ist aufgefallen, dass das Profil des Lasers bei 473 nm stark verbreitert und verzerrt war, worunter die Strahlqualität extrem litt. Diese Strahleigenschaften sind vermutlich auf eine Fehljustage im optischen Aufbau zurückzuführen. Weiterhin zeigte der Strahl eine hohe Divergenz, wodurch der Strahl am Lochraster abgeschattet wurde und an Leistung verloren hat. Durch eine Neujustage des Strahlteilers im Lasermodul 2 wäre die Behebung dieses Problems möglich, allerdings müsste der Laserstrahl dann über die Länge des gesamten optischen Wegs neu einjustiert werden.

Auch die Laserwellenlänge 1064 nm zeigt ein verzerrtes Strahlprofil. Es ist wahrscheinlich, dass diese Verzerrung durch eine Ausrichtung des Strahls auf die Kante des Strahlteilers bei der Strahlzusammenführung entstanden ist.

Die Laserwellenlänge 236 nm konnte aufgrund der verwendeten Spiegel vom Lasermodul 2 nicht zum optischen Aufbau transportiert werden. Eine Beschaffung von Laserspiegeln, die auch in diesem Bereich eine hohe Reflexion wäre finanziell aufwendig, würde aber eine weitere Untersuchung der BGF ermöglichen.

Die Strahlprofile der Laserwellenlängen 355 und 532 nm zeigen eine runde Form. Der zweite Punkt im Profil des 532 nm-Strahls kann durch eine Reflexion entstanden sein.

Die Abnahme der Laserleistungen hängt sehr wahrscheinlich mit Staubablagerungen auf den optischen Komponenten zusammen, da auch Optiken vertikal im 45°-Winkel angebracht wurden. Dieser Leistungsverlust von durchschnittlich 10 % hat einen Einfluss auf alle Ergebnisse der Messkampagne, da zunehmend weniger Leistung zur Anregung der Fluoreszenz der Blätter zur Verfügung stand. Wären die Laserleistungen täglich notiert worden, hätte eine Normierung der Messdaten auf diese veränderten Leistungen stattfinden können. Das Einsetzen des Demonstrator in ein Staubgeschütztes Gehäuse könnte diesem Problem, vor allem auch für Feldmessungen entgegenwirken.

Die Verwendung des 4-Kanal Detektors zeigt ein großes Potential zur Detektion von BGF ChlF für den vinoLAS Demonstrator. Wie die Daten in **Abbildung 18** zeigen, ist der Detektor durch die Hohe Auslesefrequenz der APDs in der Lage Unterschiede in der Fluoreszenz der Weinblätter mit einer hohen zeitlichen Auflösung darzustellen. Bei einer Verwendung des vinoLAS-Systems im Weinberg wäre dadurch möglicherweise eine Unterscheidung zwischen Blattmaterial und Hintergrund, sowie die Erkennung anderer Pflanzenteile möglich. Die Scanmessungen über eine gesamte Topfreife in **Unterunterabschnitt 4.4.13** haben unter anderem ergeben, dass die Anwesenheit von anderen Bestandteilen der Pflanze im Scanbereich zu veränderten Anteilen der BGF- und ChlF-Signale im LIF-Spektrum führt. Ein Nachteil dieser Detektionssysteme ist die hohe Empfind-

lichkeit gegenüber Erschütterungen und Beschleunigungen. So haben sich die im Cage-System verbauten Strahlteiler des 4-Kanal Detektors bei der Installation auf das Scan- und Detektionsmodul verstellt und mussten neu justiert werden. Für eine Mobilisierung des Demonstrators sollte eine Lösung gefunden werden die Optikkomponenten permanent zu justieren. Die Treiberprobleme, die zur Unbrauchbarkeit der APD-Daten führten, gilt es für eine zukünftige Verwendung des Detektors zu beheben.

Für die Inokulation der Topfreben wurde eine Sporangiensuspension mit einer Konzentration von 4×10^5 Sporangien/mL gewählt, um einen hohen Befall mit falschem Mehltau zu erreichen, trotzdem konnte nur ein leichter Befall erreicht werden. Die Wahl der Konzentration beruht auf früheren Versuchen, bei denen mit einer Konzentration von 3×10^5 Sporangien/mL bei Topfreben der Sorte Müller-Thurgau ein starker Befall erreicht wurde. Dieser starke Befall konnte auf den Riesling-Proben nicht reproduziert werden.

Wie in **Unterunterabschnitt 4.3.1** beschrieben, äußerte sich der Befall auf den inokulierten Topfreben hauptsächlich auf den oberen Blättern, während die unteren Blätter nur minimale Symptome zeigten. Da sich die gemessenen Blätter im unteren Bereich der Rebe befanden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Ergebnisse dieser Arbeit den Befall falsch abbilden und eher Hinweise auf einen niedrigeren Befall geben. Ein Grund für diesen Befallsgradienten entlang der Reben könnte die zweite Befeuchtung der Blätter eine Woche nach Inokulation sein. Dabei wurden die Blattunterseiten vom Pflanzentopf aus nach oben mit entsalztem Wasser eingesprüht. Sporangien auf der Blattunterseite, welche noch nicht durch ein Appressorium im Blattgewebe verankert waren, könnten so versehentlich durch den höheren Sprühdruk auf den unteren Blättern abgespült worden sein.

An dieser Stelle soll die Terminologie des Begriffes der *gesunden* Topfreben diskutiert werden. Die Reben dieser Kontrollgruppe wurden nicht inokuliert und stellen daher das gesunde Äquivalent zu den befallenen Reben dar. Diese Bezeichnung bezieht sich allerdings nur auf die relative Gesundheit zu den befallenen Reben. Da alle Proben bereits mit einer Infektion von echtem Mehltau erhalten wurden, kann keine dieser Reben als absolut gesund bezeichnet werden.

Der Befall mit echtem Mehltau äußerte sich auf allen erhaltenen Topfreben als weißer Belag auf der Blattoberfläche, welcher erfolgreich und persistent durch feuchtes Abwischen entfernt werden konnte. Da die Reben durch den echten Mehltau bereits ab Erhalt mit einem Pathogen befallen waren, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Pflanze schon zu Beginn der Messkampagne Stilbene als Reaktion auf den Befall gebildet hatte. Die BGF setzte sich vor der Inokulation mit echtem Mehltau demnach aus der Fluoreszenz der Stilbene und der Ferulasäure in den Zellwänden zusammen. Die in dieser Arbeit detektierten Unterschiede in der BGF lassen sich deshalb hauptsächlich auf die Ausbreitung des Pilzmyzels im

intrazellulären Raum der Blätter und die Ausbildung von Sporangienträgern auf der Blattunterseite zurückführen. Die Messung der Anregungsemissionsspektren in **Unterunterabschnitt 4.4.4** zeigen, dass die Sporangien nur im Bereich der BGF fluoreszieren und die Intensität der ChlF nicht durch den Befall erhöht wird. Diese Fluoreszenzmessungen Sporangiensuspension in **Unterunterabschnitt 4.4.4** und **Unterunterabschnitt 4.4.5** belegen vor allem, dass die BGF der Riesling-Blätter durch den Befall von falschem Mehltau *direkt* beeinflusst wird, sobald sich das Pathogen im Blatt ausgebreitet hat und neue Sporangien auf der Blattunterseite bildet. Eine quantitative Einschätzung über den Anteil der Fluoreszenzintensität von *Plasmopara viticola* in der BGF wäre das Ziel für weitere Untersuchungen. Anhand der Messungen in **Unterunterabschnitt 4.4.4** und **Unterunterabschnitt 4.4.5** lässt sich der Anteil nicht abschätzen, da die erhaltenen Spektren nur einen Hinweis auf das Vorhandensein der Fluoreszenz bieten. Da die Sporangiensuspension während der Messung im Fluoreszenzspektrometer und am vinoLAS-Demonstrator einer Sedimentation unterlag, konnte die Suspension nicht in einer konstanten Konzentration gemessen werden. Die Messungen sind daher weder reproduzierbar, noch für eine quantitative Aussage geeignet. Für zukünftige Messungen könnte ein Aufbau verwendet werden, bei dem die Sporangiensuspension in der Küvette während der Messung permanent mit einem Rührschwein durch einen Magnetrührer gerührt wird. Die Messungen in **Unterunterabschnitt 4.4.4** haben gezeigt, dass eine optimale Anregung der Fluoreszenz von *Plasmopara viticola* durch eine Lichtquelle mit einer Wellenlänge um 310 nm möglich wäre. Dieser Wellenlängenbereich ließe sich theoretisch durch einen XeCl-Excimerlaser oder einen frequenzverdoppelten Farbstofflaser erreichen, beide Typen wären in einem mobilen Aufbau aufgrund ihrer Ausmaße aber eher unpraktisch.¹⁷

Die Messungen der Unter- und Oberseite des gesunden und befallenen Blattes in **Unterabschnitt 4.2** und **Unterunterabschnitt 4.4.3** haben durch die erhöhte BGF und ein verändertes ChlF-Verhältnis gezeigt, dass eine Unterscheidung zwischen einem gesunden und stark befallenen Blatt durch LIF-Messungen möglich ist. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden für die Messungen die gleichen beiden Blätter verwendet und die Messungen direkt hintereinander ausgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass der BFRR_UV-Index des befallenen Blattes aufgrund der Sporangienträger auf der Blattunterseite dort um den Faktor 2.7 größer ist als auf der Oberseite. Da das ChlF-Verhältnis auf der Unterseite des gesunden und befallenen Blattes größer ist als auf Oberseite, kann daraus geschlossen werden, dass der Chlorophyllgehalt auf der Oberseite höher ist. Da die Weinpflanze zur Photosynthese mit der Blattoberseite zur Sonne gerichtet ist, scheint diese Schlussfolgerung plausibel zu sein.

Die Auswertung der Ergebnisse der Messkampagne anhand der Boxplots hat gezeigt, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Bewässerungszeit-

punkten der Topfreben und der Fluoreszenzindizes, bzw. Reflektionswerte besteht. Daher können keine direkte Aussagen zum Wasserstress der Topfreben getroffen werden. Allerdings konnte im Boxplot der Anregungswellenlänge 532 nm in **Abbildung 22 (c)** erkannt werden, dass die Trockenheit einen großen Einfluss auf die nicht bewässerte Rebe der Kontrollgruppe hatte. Das ChlF-Verhältnis dieser Probe lag bei höheren Werten als die befallenen Proben. Dieses Verhalten konnte allerdings nicht bei der nicht bewässerten, befallenen Topfrebe reproduziert werden, weshalb weitere Untersuchungen mit mehreren dehydrierten Reben für konkretere Aussagen nötig sind.

Generell unterlagen alle Topfreben der beiden bekannten Gruppen (inokuliert und gesunde Kontrollgruppe) dem gleichen mechanischen Stresslevel. Durch das Fixieren der Blätter auf der Messplatte wurden diese in einem ähnlichen Maß mechanisch belastet. Es kam während der Messkampagne allerdings bei keiner Probe zu einem Abknicken des Blattstiels oder sogar zur Abtrennung eines Blattes.

Die Beleuchtungsdauer der Pflanzen hat sich aufgrund der stattfindenden Messungen aus **Unterabschnitt 4.4** neben der eigentlichen Messkampagne um bis zu ± 3 h am Tag geändert. Zur Beschreibung des Einflusses der Beleuchtung auf die Reben könnten bei einer nächsten Messkampagne einige Reben unter Ausschluss von Licht gehalten und mit den beleuchteten Reben verglichen werden. Durch die Untersuchungen in **Unterunterabschnitt 4.4.11** zur Auswirkung der Tageszeit, an dem eine Messung stattfindet, wurde für den BFRR_UV-Index eine Standardabweichung von 0.28×10^{-3} für eine gesunde und von 0.62×10^{-3} für eine befallene Rebe erhalten. Das entspricht relativen Abweichungen von 0.2 % und 0.4 % bezogen auf einen typischen Wert von 150.00×10^{-3} des BFRR_UV-Indexes nach einer Anregung bei 355 nm aus der Messkampagne.

Bei der Fixierung des Blattes auf der Messplatte kam es zur Wölbung des Blattes und damit zu einem anderen Winkel, in dem die Messung stattfand. Für den Einfluss des Winkels wurde in **Unterunterabschnitt 4.4.7** für den BFRR_UV-Index ein Maximalfehler von 147.68×10^{-3} erhalten. Dieser Fehler ist sehr hoch und liegt im Bereich der gemessenen Werte aus der Messkampagne.

Die Abweichung in der Fluoreszenz des Blattes auf der Messplatte in x-Richtung wurde in **Unterunterabschnitt 4.4.6** in Form von mehreren Scanmessungen auf einem Blatt untersucht. Hierfür ergab sich eine Abweichung des BFRR_UV-Indexes von 14.50×10^{-3} . Diese Abweichung hat auf den BFRR_UV-Index der Messkampagne mit einer relativen Abweichung von 9.7 % einen signifikanten Einfluss. Dieser wird vermutlich durch die unterschiedliche Dichte an Blattadern entlang des Blatts hervorgerufen, welche durch ihren höheren Gehalt von Ferulasäure eine intensivere BGF auslösen.³ Aus diesem Einfluss lässt sich schlussfolgern, dass es für die Ergebnisse der Messkampagne wichtig ist, dass jedes Mal der gleiche Scanbereich eines Blattes mit dem Anregungslaser getroffen wird. Die Abhängigkeit des BFRR_UV-Indexes zum Abstand von der Probe zum

Scanspiegel wurde in **Unterunterabschnitt 4.4.10** betrachtet. Die Standardabweichung für den BFRR_UV-Index im Bereich von 120 bis 160 cm, in dem der Messpunkt liegt, beträgt 0.29×10^{-3} . Verglichen mit den Ergebnissen für diesen Index der Messkampagne ergibt sich eine relative Abweichung von 0.2%. Bei der Annäherung der Probe an den Demonstrator bei Messungen in **Abbildung 32** kam es zu einer Steigerung der Werte. Die deutlich erhöhten Werte des BFRR_UV-Indexes bis 100 cm und die wenig volatilen Werte dahinter könnten ein Hinweis darauf sein, dass der Fokuspunkt des Fluoreszenzlichts zwischen Linse und Einkopplung in den Lichtwellenleiter auf einen Randbereich dessen Endes geworfen wurde und deshalb nicht der komplette Querschnitt des Lichtkegels auf die Apertur der Faser getroffen hat. Bei Defokussierung durch die Annäherung der emittierenden Probe an den Demonstrator könnte dann ein vergrößerter Lichtkegel die gesamte Apertur des Faserendes abgedeckt haben, was womöglich zu einem erhöhten Lichtdurchsatz geführt hat. Bei weiterer Annäherung der Probe würde ein sich darüber hinaus aufweitender Lichtkegel den logarithmischen Abfall von 100 bis 40 cm erklären. Bei dieser Argumentation ist jedoch darauf zu achten, dass es sich bei den diskutierten Werten um Verhältnisse handelt. Dies bedeutet, dass sich die Anteile F_{Blau} und F_{Rot2} unterschiedlich stark verändern würden. Einen Erklärungsansatz würden chromatische Aberrationseffekte bzw. Abbildungsfehler der Sammellinse liefern. Eine Möglichkeit zur Verbesserung des Aufbaus im Blick auf die Distanzabhängigkeit könnte durch den Einsatz eines Achromaten oder Apochromaten statt der herkömmlichen Sammellinse, sowie der Einbau eines Autofokussystems bieten, welches durch Lidar-Messungen (Light detection and ranging) den Abstand zum Blatt bestimmt und in Echtzeit die Position der Sammellinse anpasst. Für Messungen an Rebzeilen im Weinberg sollte die Distanz der Blätter zum Scanspiegel im Bereich von 120 bis 160 cm liegen, da in diesem Bereich die geringste Abweichung liegt. Auch für diese Anwendung wäre die Verwendung eines Autofokussystems sinnvoll. In weiteren Untersuchungen könnten Messungen mit geringeren Abständen um die Distanz des Messpunktes durchgeführt werden, um den Einfluss der Distanzabhängigkeit auf den BFRR_UV-Index in diesem Bereich genauer zu untersuchen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Messkampagne ist es wichtig zu beachten, dass sich diese ausschließlich auf ein Blatt pro Topfrebe beziehen. Durch die Messung von zehn verschiedenen Blättern einer befallenen Topfrebe in **Unterunterabschnitt 4.4.12** konnte gezeigt werden, dass der BFRR_UV-Index einer Standardabweichung von 1.40×10^{-3} innerhalb einer Rebe unterliegt, was einer relativen Abweichung von 0.9% bezogen auf einen typischen Wert von 150.00×10^{-3} des BFRR_UV-Indexes nach einer Anregung bei 355 nm aus der Messkampagne entspricht.

Eine Abweichung durch unterschiedlich lange Fluoreszenzanregungszeiten innerhalb der Messkampagne ist bei den vorgestellten Messungen nicht gegeben, da diese bei jeder Messung 20 s betrug und aus 10 Scanbewegungen über das Blatt

bestand. In **Unterunterabschnitt 4.4.8** konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensitäten bei wiederholter Anregung abnehmen. Die Sensorcounts in **Abbildung 30** zeigen, dass eine stärkere Abnahme der ChlF stattfindet, was zu einer Erhöhung des BFRR_UV-Indexes über die Anzahl der Wiederholungen n führt. Diese Beobachtung ist mit dem Kautsky-Effekt zu begründen.⁴³ Die wiederholte Anregung hat mit einer Änderung von 0.13×10^{-3} pro Wiederholung einen Einfluss von 0.1 % auf den BFRR_UV-Index der Messkampagne. Eine Änderung der Fluoreszenzintensität zeigt sich vermutlich auch über die Dauer der Anregungszeit, bei der das Blatt vom Laser abgescannt wird. Da sich diese Zeit aber nicht ändert, fällt dieser Effekt nicht ins Gewicht. Eine Abnahme der Sensor Counts mit der Zeit konnte sich außerdem in einigen Datensätzen des 4-Kanal Detektors erkennen lassen. Durch die Anregung mit der Scanbewegung kam es an keinem der Blätter während der Messkampagne zu Strahlenschäden. Das Riesling-Blatt in **Abbildung 19 (b)** zeigt stellvertretend nur eine Nekrotisierung durch den falschen Mehltau, aber keine linienförmige Schäden durch die Laseranregung zwischen den Scanmarkierungen.

Die Scanmarkierungen beeinflussen das Fluoreszenzsignal durch eine Abschattung des Blattes, für den Fall dass das Blatt falsch auf der Messplatte positioniert wurde. In **Unterunterabschnitt 4.4.9** wurde durch LIF-Messungen auf einem Blatt mit absichtlich gesetzten Markierungen im Scanbereich festgestellt, dass davon die BGF deutlich weniger betroffen ist, als die ChlF. Es ist denkbar, dass es zu einer Absorption durch den Markerfarbstoff im Wellenlängenbereich der ChlF kommt. Da die BGF und die ChlF unterschiedlich stark gedämpft werden, hat dies mit einem Verlust von 6.8 % auf den BFRR_UV-Index einen deutlich stärkeren Einfluss, als auf das ChlF-Verhältnis, welches in der Messung nur um -0.5 % abnahm. Weiterhin wurde durch LIF-Messungen an einem Markerpunkt untersucht, ob die Inhaltsstoffe dieses Markers selbst zur Fluoreszenz neigen. Die Ergebnisse zeigen, dass von dem Marker selbst keine Fluoreszenz ausgeht, sondern dieser nur einen dämpfenden Effekt auf die Fluoreszenz des Blattes hat. In weiteren Messungen könnte die Markerfarbe gelöst und die Absorptionseigenschaften mittels UV-VIS Absorptionsspektroskopie untersucht werden um die Ergebnisse zu validieren. Während der Messkampagne konnte bei keiner Probe ein Schaden am Blatt in Form von Verfärbung oder Fäulnis um die Markierungen festgestellt werden.

Die Umgebung, in der alle Messungen dieser Arbeit (mit Ausnahme der Feldmessungen) gemacht wurden, war ein offener Kellerraum, in den nur wenig Tageslicht und künstliches Licht gelangten. Unterschiedliche Lichtsituationen wirkten sich in diesem Rahmen wenig auf die Messungen aus, da zu jeder Messung eine Referenzmessung erstellt wurde.

Der Einfluss durch Messungen von verschiedenen Personen innerhalb der Messkampagne ist gering. Außer an zwei von 17 Tagen wurden die bekannten Proben nur von einer Person gemessen. Die unbekanntenen Proben wurden außerdem an

zwei Tagen von einer anderen Person gemessen. Da die tägliche Messroutine durch das in dieser Arbeit entwickelte Python-Messskript angeleitet wurde, gibt es keine Abweichungen in der Reihenfolge der gemessenen Proben oder Wellenlängen.

Generell ist das Vorgehen die Einflüsse und Fehler aus dem Abschnitt **Unterabschnitt 4.4** direkt miteinander und mit den Ergebnissen der Messkampagne zu vergleichen nicht sehr genau. Folgende Diskussion bezieht sich nur auf die Einflüsse des BFRR_UV-Indexes: Die meisten Faktoren der Messungen an der Rebe beeinflussen sich gegenseitig. Einige der in **Unterabschnitt 4.4** untersuchten Einflüsse auf die Messungen beeinflussen sich gegenseitig. So ist jede Messung mit dem Fehler der Distanz von 0.29×10^{-3} und dem Maximalfehler der Winkelabhängigkeit von 147.68×10^{-3} belastet. Weiterhin unterliegen die Messungen der Abweichung zu verschiedenen Tageszeiten von 0.2% für gesunde und 0.4%. Bei der Bestimmung der Distanz- und Winkelabhängigkeit unterliegen die Ergebnisse dem Einfluss der wiederholten Anregung von 0.13×10^{-3} pro Wiederholung. Für die Messungen der Messkampagne gilt neben diesen Einflüssen auch noch die Unsicherheit 1.40×10^{-3} der Fluoreszenzunterschiede auf einem Blatt bei Abweichungen des Scanbereichs auf dem zu messenden Blatt, sowie die relative Abweichung von 6.8% auf den BFRR_UV-Index der Messmarkierung auf die Messung.

Bei der randomisierten Bestimmung der Proben mit unbekanntem Zustand wurden diese mit dem Datensatz der Messkampagne der bekannten Riesling-Topfreben im Keller bestimmt. Bei Feldmessungen im Weinberg ist solch eine Prognose potentiell problematisch, da die Weinreben in einer völlig anderen Umgebung sind und unter freiem Himmel gemessen wird. Außerdem zeigen die Feldmessungen im Weinberg dieser Arbeit, dass wohl auch die Rebsorte eine große Rolle auf die Fluoreszenzsignaturen hat. Für die Erkennung befallener Reben ist deshalb ein großer Satz an Trainingsdaten notwendig.

Ausblick: In zukünftigen Auswertungen kann ein weiterer Fokus auf die weniger diskutierten Anregungswellenlängen gelegt werden. Die Einführung eines weiteren Indexes, welcher sowohl Verhältnisse wie der BFRR_UV-Index oder das ChlF-Verhältnis, als auch die Intensitäten der jeweiligen Banden berücksichtigt, wäre hilfreich. Weiterhin könnte die Reflexionswellenlänge 1064 nm in Zukunft für eine Normierung der Messdaten über den Zeitraum der Messkampagne genutzt werden. Die Auswertung der Ergebnisse nach einer Anregung von 473 nm in **Abbildung 21** haben gezeigt, dass auch die Fluoreszenzintensität eine Rolle spielt. Weiterhin können auch die aufgezeichneten Daten der täglichen Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbestimmungen zur Auswertung hinzugezogen werden. Zudem könnten durch die Auswertung mit einer Hauptkomponentenanalyse, oder mit maschinellem Lernen weitere Zusammenhänge in den Daten finden lassen, die bei den bisherigen Auswertemethoden nicht offensichtlich waren. Auch die Befallsprognosen in **Unterabschnitt 4.4.15** könnten von maschinellem Lernen profitieren, für bei-

de Ansätze würde es aber einen deutlich größeren Datensatz an Trainingsdaten benötigen, der auch LIF-Daten unterschiedlicher Rebsorten mit einschließt.

Für den Aufbau des vinoLAS-Demonstrators wäre die Einführung einer gegateten Detektion ein weiterer Entwicklungsschritt. Falls in Zukunft bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden sollte, könnten die Pulse der unterschiedlichen Wellenlängen durch Lichtwellenleiter verzögert werden um nacheinander die Probe anzuregen. Es würde dann durch das Lasertriggersignal eine Detektion für dieses Zeitfenster der Anregung geschaltet, was in einer Feldmessung das Einfangen von weniger Sonnenlicht bedeuten würde. Da in **Unterunterabschnitt 4.1.4** die Pulsbreite der Triggersignale im Mittel auf ca. 250 ns bestimmt wurde müsste die Faser für die Verzögerung um eine Triggerperiode jedoch eine Länge von 75 m haben. Eine gegatete Detektion wäre in jedem Falle hilfreich für Feldmessungen am Tag.

Da in **Unterunterabschnitt 4.4.8** gezeigt werden konnte, dass sich die Fluoreszenz des Blattes bei wiederholter Anregung verändert, wären hierzu für solch einen Aufbau außerdem weitere Untersuchungen notwendig.

Für die Mobilisierung des Demonstrators wäre es sinnvoll ein System für eine gemeinsame Stromversorgung der Geräte über ein einziges Netzteil einzuführen. So wurde in dem entwickelten Aufbau dieser Arbeit viel Platz und Gewicht alleine für die vier Netzteile der APDs verbraucht.

Für Feldmessungen im Weinberg ist weiterhin ein Sicherheitsmechanismus für den Laserschutz notwendig. Dieser müsste erkennen, ob sich der Anregungslaser noch auf der Rebzeile oder schon darüber oder daneben befindet und die Laseremission in diesem Fall unterdrücken. Da mit Hilfe des 4-Kanal Detektors dieses Aufbaus eine hohe zeitliche Auflösung der Fluoreszenz im Scanprozess möglich war, wäre dieser Detektor eventuell ein Ausgangspunkt.

Nach den Ergebnissen der Messkampagne ist es für eine weitere Kompaktisierung des Demonstrators sinnvoll sich auf das Lasermodul 1 zu beschränken. Da die Ergebnisse der Anregung mit 473 nm nicht vielversprechend waren und sich für diese Wellenlänge ein ganzes Lasermodul im Aufbau befindet, wäre es sinnvoll auf das Lasermodul 2 zu verzichten.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der vinoLAS-Labordemonstrator mit dem Ziel der Fern-detektion von Mykosen im Weinbau mittels LIF-Messungen (laserinduzierte Fluoreszenz) entwickelt. Der Aufbau des optischen Systems und die Datenverarbeitung erfolgten bis auf wenige Komponenten von Grund auf. Der optische Aufbau besteht aus zwei Lasermodulen mit den Wellenlängen 355, 473, 532 und 1064 nm zur LIF-Anregung und für Reflexionsmessungen sowie einem Scan- und Detektionsmodul mit einem motorisierten Scanspiegel, einem Spektrometer und einem 4-Kanal-APD-Detektor (Vorarbeit).

In einer Messkampagne über 17 Tage wurden zehn gesunde Riesling-Topfreben als Kontrollgruppe und zehn Topfreben, welche nach vier Tagen mit dem Erreger des falschen Mehltaus, *Plasmopara viticola*, inokuliert wurden, untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Detektion des falschen Mehltaus auf den Weinblättern der Topfreben mittels LIF-Messungen möglich ist und befallene von nicht befallenen Proben mit dem Einsatz des Demonstrators unterschieden werden können. Unter allen Laser-Anregungswellenlängen hat sich die Wellenlänge 355 nm als nützlichste herausgestellt, da diese in der Lage ist, sowohl die BGF (blau-grüne Fluoreszenz), als auch die ChlF (Chlorophyllfluoreszenz), anzuregen. Der BFRR_UV-Index (Blue to Far Red Ratio, UV-Anregung) wurde als Verhältnis dieser beiden Signale in der vorliegenden Arbeit als Indikator für den Gesundheitszustand der Reben genutzt. Hier führte ein Befall zu höheren Indexwerten. In einem randomisierten Experiment konnte anhand dieser Auswertung der Zustand von zehn unbekanntem Proben mit einer Genauigkeit von 90 % bestimmt werden. Weiterhin wurden in dieser Arbeit Messungen anhand der Anregungswellenlänge 532 nm durchgeführt, was eine Auswertung mit dem ChlF-Verhältnis ermöglichte. Auch anhand dieser Anregung war eine Unterscheidung zwischen gesunden und befallenen Reben möglich. Der Zustand der Unbekannten konnte anhand der Auswertung mit dem ChlF-Verhältnis mit einer Genauigkeit von 50 % bestimmt werden. LIF-Messungen bei einer Anregung mit 473 nm brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Auch Reflexionsmessungen mit einer Laserwellenlänge von 1064 nm zeigten keine Unterschiede zwischen den Inokulationsgruppen. Die Messungen mit dem vinoLAS-Demonstrator ermöglichte eine Unterscheidung von befallenen und gesunden Topfreben innerhalb der Messkampagne nach 8 dpi (days post inoculation). Zu diesem Zeitpunkt traten auch sichtbare Symptome des Befalls der Topfreben mit falschem Mehltau auf. Mit diesen Ergebnissen ist ein Monitoring über Pilzbefall auf Weinreben mit dem vinoLAS-Demonstrator prinzipiell möglich. Eine Früherkennung war in dieser Arbeit aufgrund eines Fehlers in der Inokulation nicht möglich. Dieser führte zu einem unerwartet niedrigem Befall. Voruntersuchungen aus einer früheren (eigenen) Arbeit zeige jedoch, dass eine Früherkennung bei starkem Befall mit der Auswertung des BFRR_UV-Indexes möglich ist. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich ein Befall durch eine gelbliche Verfärbung der Lamina und eine Nekrotisierung des Pflanzengewebes auf der Ober- und Unterseite des

Blattes äußert. Diese Verfärbung wird durch eine Veränderung des Chlorophyllgehalts hervorgerufen und führt zu einem Anstieg des ChlF-Verhältnisses. Auf der Blattunterseite führt ein Befall zur Ausbildung von Sporangienträgern. Es wurde herausgefunden, dass die Ausbildung des Pilzmaterials im und unter dem Blatt zu einer Erhöhung der BGF führt. Diese wird weiterhin durch die Produktion von Phytoalexinen erhöht, was zusammen mit der Mykofluoreszenz zum Anstieg des BFRR_UV-Indexes führte.

In weiteren statistischen Messungen wurde untersucht wie sich unterschiedliche Faktoren der Messung auf die Ergebnisse der Auswertung anhand der Indizes auswirken. So haben die Lage des Scanbereichs auf dem Weinblatt, die Winkelabhängigkeit der Anregung und die versehentliche Messung von Scanmarkierungen auf dem Blatt einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse.

Mit dem Aufbau des Labordemonstrators konnte eine nichtinvasive Methode zur Ferndetektion von Mykosen entwickelt werden. Bei keiner Blattprobe traten nach den LIF-Messungen Strahlenschäden durch die Laseranregung auf.

Zum Abschluss der Messkampagne wurden Feldmessungen mit dem Demonstrator-Aufbau im Weinberg durchgeführt. Eine Anregung und Detektion der ChlF war bei Nacht möglich. Unter Einfluss von Tageslicht wurde die laserinduzierte Fluoreszenz von der Autofluoreszenz durch die Sonne überlagert.

Die Daten der Messkampagne bieten noch großes Potential für weitere Auswertungen. So können die Messungen noch anhand anderer Indizes, mit einer Hauptkomponentenanalyse oder maschinellem Lernen ausgewertet werden. Der Demonstrator kann in Zukunft durch das Einsparen unnötiger Anregungswellenlängen und den Einbau einer gemeinsamen Stromversorgung weiter kompaktiert und entwickelt werden. Wenn eine Möglichkeit gefunden wird, den optischen Aufbau vor Erschütterungen zu sichern und den Demonstrator in ein Gehäuse zu fassen, können weitere Feldmessungen im Weinberg stattfinden.

7 Literatur

- [1] C. C. Steel, J. W. Blackman, L. M. Schmidtke, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 5189–5206.
- [2] K. Yu, G. Leufen, M. Hunsche, G. Noga, X. Chen, G. Bareth, *remote sensing* **2014**, *6*, 64–86.
- [3] M. Bélanger, J. Roger, P. Cartolaro, A. A. Viau, V. Bellon-Maure, *International Journal of Remote Sensing* **2008**, *29*, 1707–1724.
- [4] K. Bürling, M. Hunsche, G. Noga, *Applied Spectroscopy* **2012**, *66*, 1411–1419.
- [5] H. Lichtenthaler, M. Lang, M. Sowinska, F. Heisel, J. Miehe, *Journal of Plant Physiology* **1996**, *148*, 599–612.
- [6] B. Kautz, M. Hunsche, G. Noga, *Agriculture* **2014**, *4*, 132–146.
- [7] R. S. Gabor, A. Baker, D. M. Mcknight, M. Miller, *Fluorescence indices and their interpretation*, Cambridge University, **2014**.
- [8] T. Adão, J. Hruška, L. Pádua, J. Bessa, E. Peres, R. Morais, J. J. Sousa, *Remote Sensing* **2017**, *9*, 1110.
- [9] P. W. Atkins, J. De Paula, *Physikalische Chemie/[Hauptbd.]*, Wiley-VCH, 5th ed., **2013**.
- [10] G. Schwed, T. C. Schmidt, O. J. Schmidt, *Analytische Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH, **2016**.
- [11] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie, Vol. 2*, Vieweg+Teubner, **2011**.
- [12] C. N. Banwell, E. M. McCash, *Molekülspektroskopie*, Oldenbourg Verlag, München and Wien, **1999**.
- [13] T. Engel, P. Reid, *Physikalische Chemie*, Pearson Education, **2006**.
- [14] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], **2000**.
- [15] P. W. Atkins, J. de Paula, *Atkins' physical chemistry*, Oxford Univ. Press, Oxford, 8th ed., **2006**.
- [16] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 5th ed., **2004**.
- [17] D. Meschede, *Optik, Licht und Laser*, Vieweg+Teubner, **2008**.
- [18] W. Demtröder, *Laserspektroskopie*, Springer Spektrum, 6th ed., **2011**.
- [19] H. Vogel, C. Gerthsen, *Gerthsen Physik*, Springer, 25th ed., **2015**.

- [20] W. Meier, *Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt - Institut für Verbrennungstechnik*.
- [21] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676–1683.
- [22] P. A. Tipler, G. Mosca, *Physik: für Studierende der Naturwissenschaften und Technik*, Springer Spektrum, 8th ed., **2019**.
- [23] G. H. Krause, E. Weis, *Photosynthesis Research* **1984**, *5*, 139–157.
- [24] A. A. Gitelson, C. Buschmann, H. K. Lichtenthaler, *Journal of Plant Physiology* **1998**, *152*, 283–296.
- [25] E. Rosenqvist, O. van Kooten, *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* **2003**, 31–77.
- [26] L. Chaerle, D. Hagenbeek, E. De Bruyne, R. Valcke, D. Van Der Straeten, *Plant. Cell Physiol.* **2004**, *45*, 887–896.
- [27] L. Cséfalvay, G. Di Gaspero, K. Matouš, D. Bellin, B. Ruperti, J. Olejníčková, *Eur. J. Plant. Pathol.* **2009**, *125*, 291–302.
- [28] K. Billet, M. Malinowska, T. Munsch, M. Unlubayir, S. Adler, Delanoue, A. Lanoue, *Plants* **2020**, *9*, 1008.
- [29] L. Zhang, M. Dickinson, *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2001**, *59*, 137–141.
- [30] C. Gessler, I. Pertot, M. Perazzolli, *Phytopathologia Mediterranea* **2011**, *50*, 3–44.
- [31] S. Kamoun, O. Furzer, J. D. G. Jones, H. S. Judelson, G. S. Ali, R. J. D. Dalio, S. G. Roy, L. Schena, A. Zambounis, F. Panabières, D. Cahill, M. Ruocco, A. Figueiredo, X.-R. Chen, J. Hulvey, R. Stam, K. Lamour, M. Gijzen, B. M. Tyler, N. J. Grünwald, M. S. Mukhtar, D. F. A. Tomé, M. Tör, G. Van Den Ackerveken, J. McDowell, F. Daayf, W. E. Fry, H. Lindqvist-Kreuze, H. J. G. Meijer, B. Petre, J. Ristaino, K. Yoshida, P. R. J. Birch, F. Govers, *Molecular Plant Pathology* **2015**, *16*, 413–434.
- [32] Pflanzenforschung.de, *Journalbeitrag: Geballtes Wissen gegen den Mehltau*.
- [33] H. J. Eichler, J. Eichler, O. Lux, *Lasers : Basics, Advances and Applications*, Springer, **2018**.
- [34] C. Buschmann, G. Langsdorf, H. Lichtenthaler, *Photosynthetica* **2000**, *38*, 483–491.
- [35] G. Latouche, C. Debord, M. Raynal, C. Millhade, Z. G. Cerovic, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2015**, *14*, 1807–1813.

- [36] A. Poutaraud, G. Latouche, S. Martins, S. Meyer, D. Merdinoglu, Z. G. Cerovic, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 4913–4920.
- [37] S. Bellow, G. Latouche, S. C. Brown, A. Poutaraud, Z. G. Cerovic, *Journal of Experimental Botany* **2021**.
- [38] H. K. Lichtenthaler, *Journal of Plant Physiology* **1987**, *131*, 101–110.
- [39] A. A. Gitelson, C. Buschmann, H. K. Lichtenthaler, *Remote Sensing of Environment* **1999**, *69*, 296–302.
- [40] U. Kutschera, *Prinzipien der Pflanzenphysiologie*, Spektrum, Akad. Verl., 2nd ed., **2002**.
- [41] M. Moriondo, S. Orlandini, A. Giuntoli, M. Bindi, *Journal of Phytopathology* **2005**, *153*, 350–357.
- [42] N. Zhang, G. Yang, Y. Pan, X. Yang, L. Chen, C. Zhao, *Remote Sensing* **2020**, *12*, 3188.
- [43] H. Kautsky, A. Hirsch, *Naturwissenschaften* **1931**, *19*, 964.
- [44] A. Gossauer, *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: Eine Einführung in die organische Chemie*, Helvetica Chimica Acta Wiley-VCH, **2006**.
- [45] L. Donaldson, N. Williams, *Plants* **2018**, *7*, year.
- [46] K. Bosch, *Formelsammlung Mathematik*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, **2018**.