

In-vivo-Messung des Blattwassergehalts mit Terahertz-Strahlung

Thomas Kinder, Thomas Müller-Wirts, TEM Messtechnik GmbH, Hannover
 Björn Breitenstein, Dirk Selmar, TU Braunschweig
 Michael Schwerdtfeger, Maik Scheller, Ole Peters, Martin Koch, Universität Marburg

Für alle Pflanzen ist eine ausreichende Wasserversorgung essentiell. Wassermangel führt zu Trockenstress und massiven Wachstumseinbußen. Für die Selektion trockenheits-resistenter Nutzpflanzen sind aufwendige Untersuchungen des Wassergehalts und der resultierenden Trockenstress-Reaktionen erforderlich. Bislang waren diese Analysen zeitintensiv, und das Pflanzenmaterial wurde dabei zerstört. Die Autoren entwickelten ein auch im Feld einsetzbares Gerät, das mit Terahertz-Wellen den Wassergehalt von Pflanzenteilen erstmals unmittelbar und zerstörungsfrei *in vivo* bestimmen kann.

Dass eine Pflanze zum Leben Wasser braucht, weiß jedes Kind. Dass Wassermangel schließlich zu dauerhaftem Schaden an einer Pflanze führt, kann schmerzlich erfahren, wer aus einem mehrwöchigen Sommerurlaub zurückkehrt, wenn der mit dem Gießen beauftragte Nachbar den Wasserbedarf der Pflanzen nicht richtig eingeschätzt hat.

Diesen richtig zu ermitteln ist tatsächlich nicht trivial. Auf Wassermangel reagieren Pflanzen zunächst mit einer Reduktion ihres Stoffwechsels – was man bei wirtschaftlicher Nutzung vermeiden wird. Übermäßige Wasserversorgung ist jedoch ebenfalls oft unwirtschaftlich und in vielen Gegenden der Erde in der Landwirtschaft kaum zu leisten. Wasserbedarf und die physiologische Trockenstress-Reaktion der Pflanze auf Wassermangel sind daher weltweit Gegenstand der Forschung. Ziel ist dabei nicht nur, Wege für eine möglichst gute wirtschaftliche Nutzung der Pflanzen zu finden, sondern auch Selektionskriterien für die Züchtung trockenstresstoleranter Genotypen zu schaffen und messbar zu machen.

leistungsflüssigchromatographie (HPLC), in jedem Fall unter vollständiger Zerstörung des untersuchten Pflanzenteils.

Den allgemeinen Stoffwechselstatus einer Pflanze kann man zerstörungsfrei über die Fluoreszenz des Chlorophylls bestimmen. Hierzu wird das Blatt lediglich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (ca. 650nm) und Intensität (zeitlich moduliert) beleuchtet und die Intensität des Fluoreszenzlichtes gemessen. Ob allerdings eine Abnahme der Stoffwechsellätigkeit durch Trockenheit hervorgerufen wurde, ist im Einzelfall gesondert zu untersuchen.

Der tatsächliche Wassergehalt von Pflanzenteilen (insbesondere der Blätter) wird bislang fast ausschließlich thermogravimetrisch bestimmt, das heißt durch Wägen, vollständiges Trocknen und erneutes Wägen. Freilich wird auch bei dieser Methode das Blatt zerstört.

Spektroskopische Methoden mit Nah- oder Fern-Infrarotlicht sind zwar zerstörungsfrei, reagieren aber empfindlich auf Nebenparameter wie die Reflexionsgeometrie oder die Oberflächenbeschaffenheit der Blätter.

Die wichtigsten bisherigen Methoden zur Untersuchung von Trockenstress sind also destruktiv. Dies macht wiederholte Messungen an demselben Blatt oder längere Messreihen an einem Individuum unmöglich. Und an dieser Stelle kommt die Terahertz-Technik ins Spiel. Die Autoren entwickelten ein Gerät, welches den Wassergehalt von Pflanzenteilen zerstörungsfrei *in vivo* – das bedeutet für Feldpflanzen: auf dem Acker! – räumlich und zeitlich unmittelbar bestimmen kann [1].

2 Was sind Terahertz-Wellen?

Unter Terahertz-Wellen versteht man elektromagnetische Wellen, deren Frequenz zwischen 10^{11} Hz und 10^{13} Hz liegt (12^{12} Hz = 1 THz). Die Wellenlänge beträgt entsprechend 3 mm bis 30 μ m. Dieser Bereich liegt im elektromagnetischen Spektrum zwischen Mikrowellen oder Radarwellen und langwelligem (Fern-)Infrarotlicht. Er bildete lange Zeit einen kaum erforschten „weißen Fleck“ auf der spektralen „Landkarte“ der elektromagnetischen Phänomene (Bild 1).

1 Stand der Technik

Lange bevor Trockenheit zur Schädigung der Pflanze führt, beginnt diese mit der Produktion charakteristischer Stressmetaboliten. Dazu gehören bestimmte Proteine (die Dehydrine) und Stoffwechselprodukte wie γ -Aminobuttersäure (GABA). Der Nachweis von Dehydrinen erfolgt molekularbiologisch über eine Reverse Transkriptase- und Polymerase-Kettenreaktion (PCR/RT-PCR), der von GABA mittels Hoch-

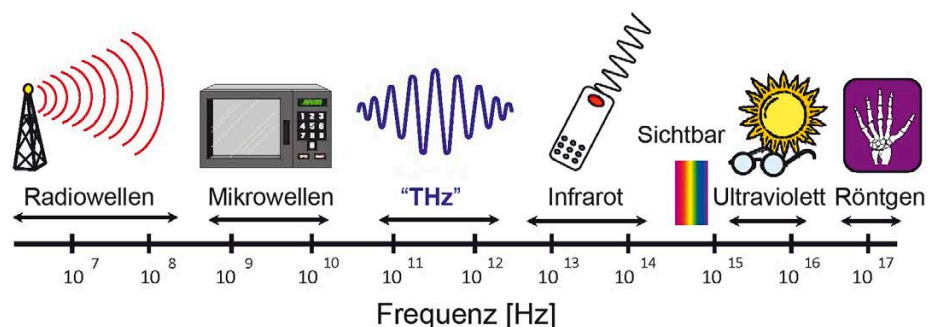


Bild 1: Einordnung der Terahertz-Strahlung im elektromagnetischen Spektrum

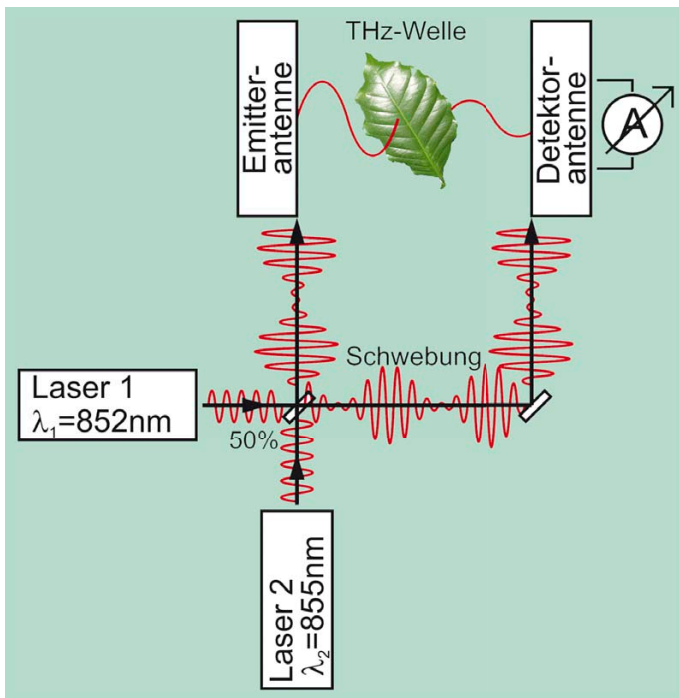


Bild 2: Prinzip der Erzeugung kontinuierlicher Terahertz-Strahlung mittels zweier frequenzstabilisierter Laser und photoleitender Antennen

Dies liegt zum einen daran, dass es in diesem Übergangsbereich von der elektronischen Hochfrequenztechnik zur Optik nur wenige, aufwendig gebaute künstliche Strahlungsquellen gab. Zum anderen fehlte die Möglichkeit, die Strahlung selektiv zu detektieren, also spektral und räumlich aufgelöst quantitativ nachzuweisen. Erst in neuerer Zeit seit dem Aufkommen handlicherer THz-Quellen setzt sich die Forschung wieder intensiv mit diesem Gebiet der Physik auseinander, denn Terahertz-Strahlung¹ besitzt interessante und nützliche Eigenschaften.

3 Emitter- und Sensorprinzip

Besonders interessant für die Pflanzenbiologie ist, dass Terahertz-Strahlung von Wasser stark absorbiert wird, während sie unpolares organisches Material nahezu verlustfrei durchdringt. Zudem ist die Energie von THz-Quanten so gering, dass eine Schädigung des Organismus (etwa durch Ionisation, wie bei Röntgenstrahlung) nicht zu erwarten ist. Die Strahlung eignet sich daher sehr gut zur Detektion von Wasser z.B. in lebendem Gewebe [2].

Terahertz-Strahlung wird in einem elektrischen Leiter erzeugt, der auf einem photoleitenden Material aufgebracht ist. Der Leiter hat eine Unterbrechung, so dass bei einer angelegten Spannung zunächst kein Strom fließt. Beleuchtet man jedoch die Anordnung im Bereich der Unterbrechung mit dem Laserlicht, so wird sie leitend, und es fließt ein Strom, dessen Stärke im „Takt“ der optischen Schwebung wechselt. Die Leiteranordnung fungiert für diesen Wechselstrom als Antenne (Emitter), die somit eine elektromagnetische Terahertzwellen aussendet.

Die Detektion erfolgt mit einer gleichartigen Antenne (Detektor), in der die einfallende Terahertzwellen einen Wechselstrom erzeugen. Dieser ist wegen der hohen Frequenz nicht direkt nachweisbar. Beleuchtet man aber auch hier die Unterbrechung mit dem Laserlicht, so wird der Strom im „Takt“ der Schwebung kurzgeschlossen. Es bleibt ein mittlerer Gleichstrom, der

Die Autoren entwickelten ein Messgerät, das Terahertz-Wellen gebündelt emittiert und nach dem Durchlaufen einer Probe in Phase und Amplitude detektiert (**Bild 2**). Es enthält zwei Laserdioden, welche kontinuierlich Licht mit jeweils einer bestimmten einstellbaren Frequenz emittieren. Die Lichtwellen werden durch Einkopplung in eine Glasfaser räumlich

leicht auf messbare Werte vergrößern lässt. Die Besonderheit liegt darin, dass die Messwerte nicht nur proportional zur Amplitude der detektierten Welle sind, sondern auch sinusförmig von ihrer Phasenlage bezüglich der Laserschwebung abhängen. Man gewinnt somit Information sowohl über die Stärke als auch über die Laufzeit der Terahertzwellen. Die Gesamtanordnung verhält sich also wie ein Mach-Zehnder-Interferometer, mit dem Unterschied, dass ein Teil des Weges kein Laser- sondern ein Terahertz-Strahlengang ist. Man kann auch von einem Terahertz-Refraktometer sprechen. Aus einem Vergleich der Amplituden- und Phasen-Daten mit und ohne eingebrachte Probe ergibt sich der (komplexe) Transmissionskoeffizient – in diesem Fall eines Pflanzenblattes. Kennt man außerdem die Blattdicke, so kann man den relativen Wassergehalt des Gewebes bestimmen. Eine Spezialität des entwickelten Gerätes ist die präzise Einstellung und Stabilisierung der Messfrequenz [3]. Von dieser hängt nämlich – wie bei vielen Interferometern – die erzielbare Phasenmessgenauigkeit ab.

4 Vergleichende Messungen im Labor

Für die Beurteilung des pflanzenbaulichen Potentials des entwickelten THz-Messgerätes sind Versuche mit Kaffeepflanzen (*Coffea arabica*) durchgeführt worden (**Bild 3**). Um den Verlauf der Stressinduktion darzustellen, wurde die THz-Transmission des Blattes bestimmt und gleichzeitig GABA als Stressmarker analysiert (**Bild 4**). Wie erwartet zeigt die Abnahme des Blattwassergehaltes hier einen progressiven



Bild 3: Pflanzenblatt zwischen den Kunststofflinsen des Terahertz-Messaufbaus

¹ Je nach Betrachtungsweise spricht man von THz-Strahlen (wenn es nur auf die geradlinig-geometrische Ausbreitung ankommt) oder von THz-Wellen (wenn Beugung oder Interferenz eine Rolle spielen).

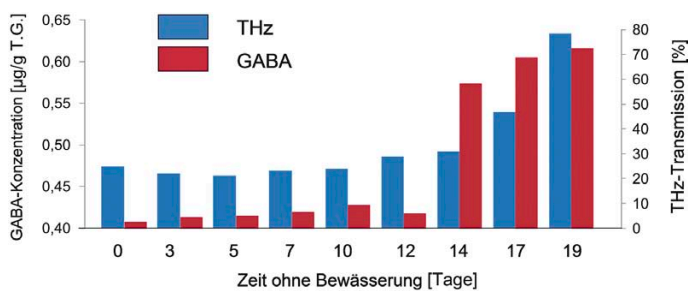


Bild 4: Zunahme der THz-Transmission und steigende Akkumulation von GABA in Kaffeepflanzen ab einem Trockenheits-Schwellenwert während eines Bewässerungsmangel-Experiments

Kurvenverlauf: Zunächst sind kaum Veränderungen im Wassergehalt zu erkennen (homöostatischer Bereich), bevor der Wassergehalt mit immer größerer Geschwindigkeit absinkt und demzufolge die THz-Transmission ansteigt [1]. Im Gegensatz zu dieser kontinuierlichen Veränderung des Wassergehaltes zeigt die GABA-Konzentration einen ganz anderen Verlauf [5]: Offensichtlich wird die Synthese und Akkumulation dieses Trockenstressmarkers erst bei einem bestimmten, minimal tolerierbaren Wassergehalt ausgelöst, d.h. der Trockenstress wird beim Unterschreiten eines Schwellenwertes induziert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Bewässerungssteuerungen mit THz-Sensorik für eine ressourcenschonende Wassernutzung eingesetzt werden können, wenn die Schwellenwerte für die Stressinduktion bekannt sind.

5 Anwendbarkeitsstudien im Feldversuch

Für die Erprobung der Praxistauglichkeit wurde mit einem Prototyp des THz-Systems



Bild 5: Bestimmung des Blattwassergehalts mittels THz-Strahlung im Rollhaus auf den Versuchsfeldern des Lehrstuhls für Pflanzenzüchtung der TU München in Weihenstephan

ein Feldversuch am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung der TU München mit unterschiedlichen Mais-Genotypen auf den Versuchsfeldern sowie im Rollhaus (Bild 5, rain-out shelter) durchgeführt. Hierbei wurden alle Parameter über Doppelbestimmungen

quantifiziert. Der Vergleich der Daten der Pflanzen aus dem Rollhaus (Trockenstress) mit denen der optimal bewässerten Kontrollpflanzen erlaubt wichtige Rückschlüsse auf die Auswirkungen des Trockenstresses.

Für die Merkmale Blattdicke und THz-Transmission konnten mittels einer Varianzanalyse signifikante Einflüsse der Behandlung (Kontrolle und Trockenstress) als auch signifikante genotypische Unterschiede zwischen verschiedenen Maislinien nachgewiesen werden.

Danksagung

Wir danken Dr. Peter Westermeier und Sebastian Gresset vom Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung der TU München für die Möglichkeit, Messungen an den dortigen Pflanzen durchführen zu können, und für den statistischen Vergleich der Messergebnisse.

Die vorgestellte Arbeit wird vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz unter der Nummer 2814501310 gefördert.

Literaturhinweise:

- [1] B. Breitenstein, M. Scheller, M.K. Shakfa, T. Kinder, T. Müller-Wirts, M. Koch, D. Selmar, *Introducing Terahertz Technology into Plant Biology: A Novel Method to Monitor Changes in Leaf Water Status*, Journal of Applied Botany and Food Quality, 84 (1), 2012, im Druck
- [2] S. Hadjiloucas, L.S. Karatzas, J.W. Bowen, *Measurements of leaf water content using terahertz radiation*, IEEE Trans Microwave Theor Tech 47(2), 1999, S. 142-149
- [3] A. Deninger, T. Göbel, D. Schönherr, T. Kinder, A. Roggenbuck, M. Köberle, F. Lison, T. Müller-Wirts, P. Meissner, *Precisely tunable continuous-wave terahertz source with interferometric frequency control*, Review Of Scientific Instruments 79, 2008, 044702
- [4] Ch. Jördens, M. Scheller, B. Breitenstein, D. Selmar, M. Koch, *Evaluation of leaf water status by means of permittivity at terahertz frequencies*, J Biol Phys 35, 2009, S. 255-264
- [5] B. Breitenstein, *In vivo-Quantifizierung von Blattwassergehalten mittel Terahertztechnik*, Dissertationsschrift, 2012, TU Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften

Ansprechpartner:

Dr. Thomas Kinder
TEM Messtechnik GmbH
Großer Hillen 38
30559 Hannover
Tel. 0511/510896-36
Fax 0511/510896-38
eMail:
thomas.kinder@tem-messtechnik.de
Internet:
www.tem-messtechnik.de



Prof. Dirk Selmar
TU Braunschweig
Institut für Pflanzenbiologie
Mendelssohnstr. 4
D-38106 Braunschweig
Tel. 0531/391-5871
Fax 0531/391-8128
eMail:
d.selmar@tu-bs.de
Internet: www.tu-braunschweig.de/ifp
www.ifp.tu-bs.de/MS4/bpsp



Prof. Martin Koch
Universität Marburg
Fachbereich Physik
Terahertz-Systemtechnik
Renthof 5
D-35032 Marburg
Tel. 06421/28-22270
Fax 06421/28-27036
eMail:
martin.koch@physik.uni-marburg.de
Internet: www.uni-marburg.de/fb13/koch
www.lytera.de

