

## Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur raschen Indikation des Befalls von Laub- und Nadelbäumen durch herbivore Insekten

### *Chlorophyll fluorescence imaging to analyse insect herbivory on broad-leaved and coniferous trees*

Manfred Forstreuter\*, Roland Schröder\*\*, Werner B Herppich\*\*\*

\* TU Berlin, Institut für Ökologie, Botanik/Angewandte Gehölzökologie, Königin-Luise-Str.22, 14195 Berlin

\*\* FU Berlin, Institut für Biologie, Haderslebener Str. 9, 12163 Berlin

\*\*\* Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam, Abt. Technik im Gartenbau, E-Mail: wherppich@atb-potsdam.de

**Kurzfassung:** Herbivore Insekten verursachen in Parkanlagen und Gärten vieler Städte oft großen Schaden. Zur erfolgreichen Bekämpfung dieser Schädlinge ist die Kenntnis ihrer Lebensweise aber auch der physiologischen Reaktionen der befallenen Pflanzen, z. B. die Emission gasförmiger Phytohormone und die damit verbundenen Stoffwechselveränderungen wichtig. Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse wurde der Einfluss unterschiedlicher herbivorer Insekten auf die Photosyntheseaktivität ihrer Wirtspflanzen qualitativ und quantitativ erfasst und die lokale und temporale Dynamik der pflanzlichen Reaktion analysiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die reversible systemische Veränderung der Photosyntheseleistung von *Pinus sylvestris* infolge der Eiablage durch die Pflanzenwespe *Diprion pini* gelegt.

**Deskriptoren:** Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse, Insektenherbivorie, Photosynthese

**Summary:** During recent years insect herbivory has caused tremendous damage to urban parks and gardens. A successful control of such pests requires exact knowledge both of the living patterns of the herbivores and of the diverse physiological plant responses to the attacking insects, e.g. the emission of gaseous phytohormones. Chlorophyll fluorescence imaging analysis was used to qualitatively und quantitatively study the effects of insect herbivory on the local and temporal dynamics of the host plants' photosynthetic activity. Major focus was laid on the reversible systemic changes in photosynthesis of *Pinus sylvestris* due to the oviposition of the sawfly *Diprion pini*.

**Keywords:** Chlorophyll fluorescence imaging analysis, insect herbivory, photosynthesis

## 1 Einleitung

In den letzten Jahren entstand in vielen städtischen Parkanlagen und Gärten durch den Befall unterschiedlicher Laub- und Nadelbaumarten durch herbivore Insekten zunehmend großer Schaden. Für eine erfolgreiche, nicht umweltbelastende präventive Bekämpfung dieser Schadinsekten ist es wichtig, die Lebensweise der Parasiten zu verstehen und die physiologischen Reaktionen der befallenen Pflanzen für die verschiedenen Befallsstadien zu kennen.

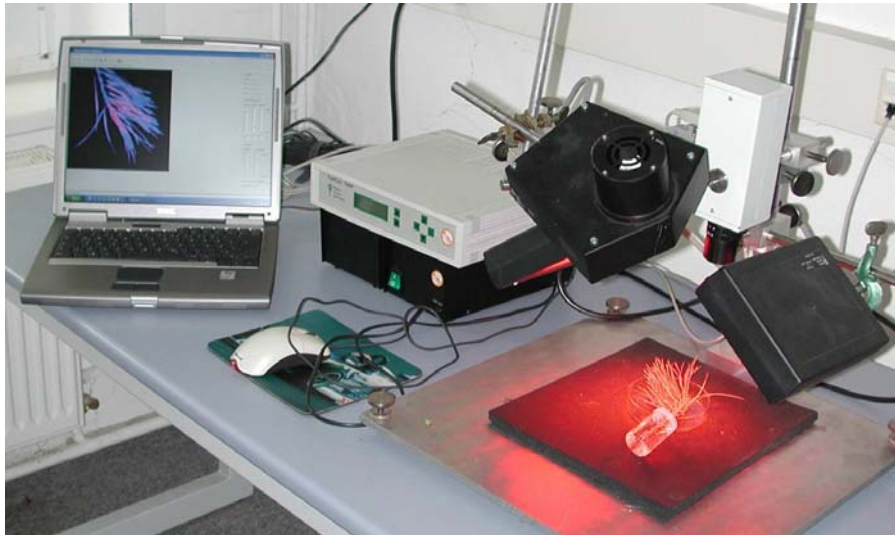
Es ist schon lange bekannt, dass Herbivorie den Primärstoffwechsel der befallenen Pflanzen verändern (WARRINGTON *et al.* 1989) und spezifische Schutzreaktionen auslösen kann (TURLINGS & WÄCKERS 2004). Schon die Deposition von Insekteneiern induziert die Emission flüchtiger Kohlenwasserstoffe (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.* 2006) so, dass Eiparasiten angelockt werden (MEINERS & HILKER 2000, COLAZZA *et al.* 2004). Die damit verbundenen Stoffwechseleränderungen beeinflussen zeitweise auch die Primärproduktion. Ob die aus der Eiablage resultierende Behinderung der Photosynthese eine Konsequenz der mit der Kohlenwasserstoffsynthese verbundenen Produktionskosten darstellt, oder nur eine nicht-adaptive Konsequenz der Verwundungsreaktion, ist nicht klar (SCHRÖDER *et al.* 2005). Dennoch könnte diese temporäre und lokale Inhibition der Photosyntheseaktivität genutzt werden, um den Befall zu detektieren und das Ausmaß zu verfolgen und zu bewerten.

Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse (NEDBAL *et al.* 2000, HERPPICH 2001, 2002, HERPPICH *et al.* 2005) ist es möglich, schnell, nichtdestruktiv und nicht-invasiv den Einfluss unterschiedlicher herbivorer Insekten auf die Photosyntheseaktivität ihrer Wirtspflanzen qualitativ und quantitativ zu erfassen und die lokale und temporale Dynamik der pflanzlichen Reaktion zu analysieren. In den hier vorgestellten Versuchen wurde dabei besonderes Augenmerk auf die systemische Veränderung der Photosyntheseleistung der Waldkiefer (*Pinus sylvestris* L.) infolge der Eiablage durch die Gemeine Kiefernbuschhornblattwespe *Diprion pini* L. gelegt (SCHRÖDER *et al.* 2005). Die Larven dieser Blattwespen verursachen an Kiefern durch Kahlfraß sehr große Schäden. Parasitoide, insbesondere Kokonparasitoide sind für die biologische Bekämpfung der Blattwespe von großer Bedeutung. Sie bauen zeitversetzt schnell hohe Populationsdichten auf und können somit erheblich (Parasitierungsraten von mehr als 90%) zur Reduzierung der Schädlinge beitragen. Dieses indirekte Abwehrsystem der Pflanze und die mit der Induktion dieser Abwehr verbundenen Investitionen der Pflanze bedürfen noch weitreichender Untersuchungen.

## 2 Material und Methoden

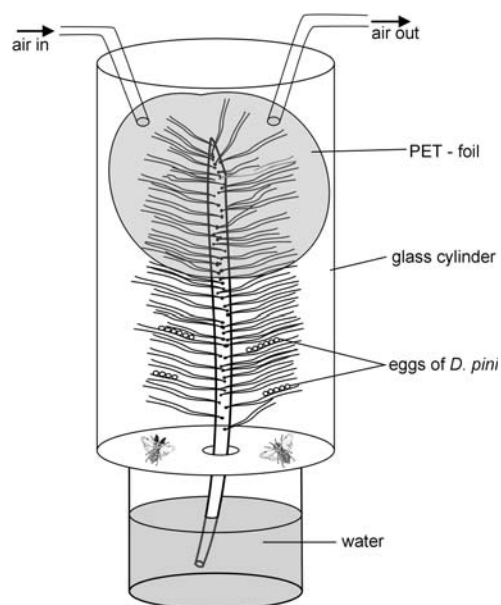
In den Laboruntersuchungen wurde an einzelnen Blättern (Bergahorn *Acer pseudoplatanus* L. bzw. Feldulme *Ulmus campestris*) bzw. an ganzen Zweigen (*Pinus sylvestris* L.) die maximale photochemische Effizienz ( $F_v/F_m$ ) als Maß für die Photosyntheseaktivität erfasst (vgl. VON WILLERT *et al.*, 1995). Dabei wurde das offene Chlorophyllfluoreszenzbild-

analysesystem FluorCam 690MF (Photon Systems Instruments, Brno, Tschechische Republik) genutzt (NEDBAL *et al.*, 2000a; HERPPICH, 2001; 2002). Dieses System besteht aus zwei LED-Einheiten (345 orange LED,  $\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$ ), einer Sättigungspulslampe (Halogenlampe 250 W, mit elektronisch gesteuertem Verschluss), einer CCD-Kamera, der Steuereinheit und einem PC (**Bild 1**).



**Bild 1:** Messung der maximalen photochemischen Effizienz ( $F_v/F_m$ ) ganzer Kiefernzweige mit einem Chlorophyllfluoreszenzbildanalysesystem FluorCam 690MF

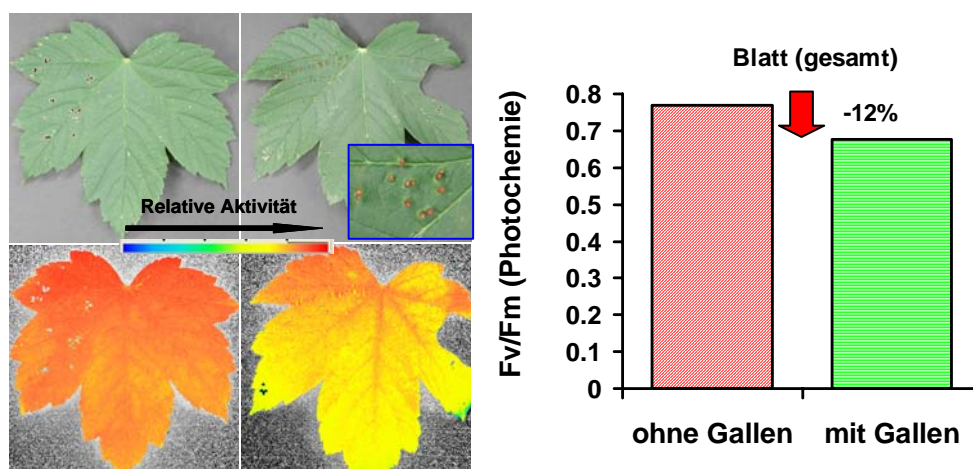
Für die Induktion der systemischen Reaktion von *Pinus sylvestris* auf die Oviposition der Kiefernbuschhornblattwespe *Diprion pini* L. wurden abgeschnittene Kiefernkurztriebe in einem abgeschlossenen Glaszylinder den Insekten ausgesetzt (**Bild 2**). Die Triebspitze war durch eine zusätzliche Plastikhülle vor den Blattwespen geschützt.



**Bild 2:** Kammer für die systemische Induktion der photosynthetischen Pflanzenreaktion durch die Oviposition der Gemeinen Kiefernbuschhornblattwespe an Kiefernadeln

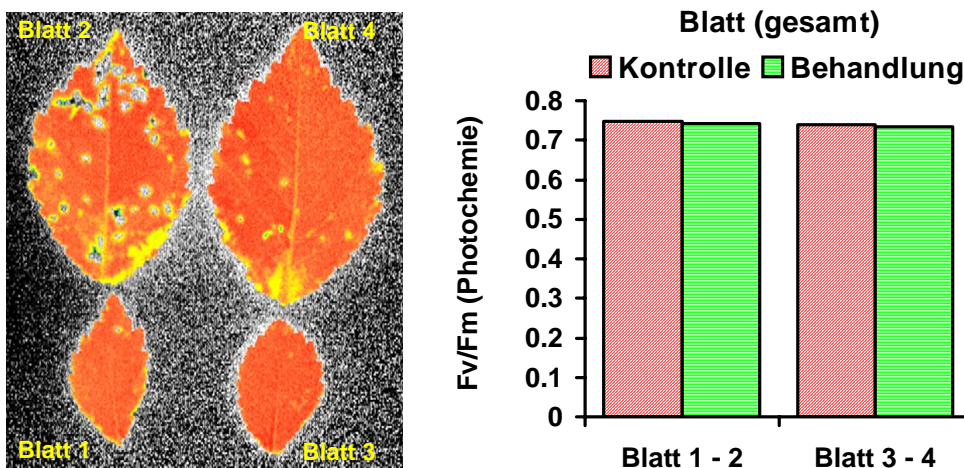
### 3 Ergebnisse und Diskussion

Werden Zellen von Bergahornblättern (*Acer pseudoplatanus* L.) von Ahorn-Gallmilben (*Aceria macroryncha*) mit ihren stilettartigen Mundwerkzeugen angestochen und ausgesaugt, induzieren die von den Gallmilben zum Verflüssigen der Zellinhalte ausgeschiedene Enzyme in einer starken Reaktion die Gallenbildung. Offensichtlich als Folge dieser Gallenbildung kommt es im gallenfreien Bereich des Blattes zu einer signifikanten Reduktion (12%) der Photosyntheseaktivität (**Bild 3**). Blattgallen von Ahorn-Gallmilben scheinen keinerlei negative Auswirkungen auf die Physiologie und das Wachstum von Gehölzen zu haben (Pflanzenschutzamt Berlin 2004).



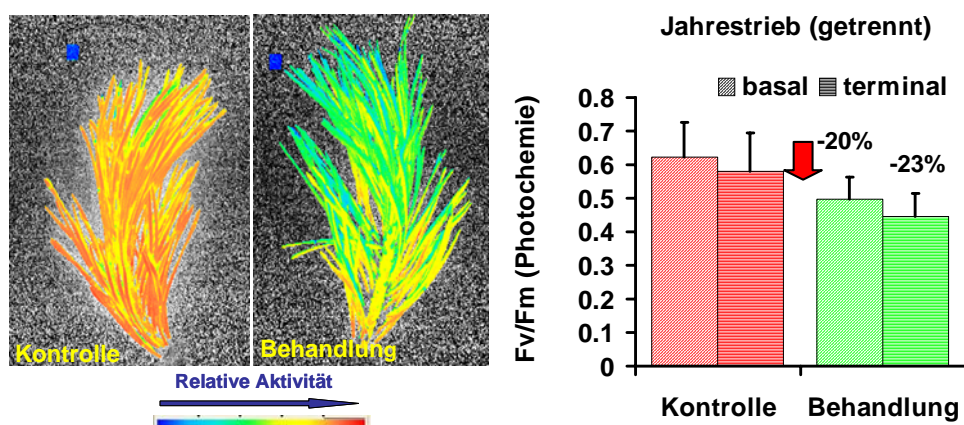
**Bild 3:** Falschfarbendarstellung der Chlorophyllfluoreszenzbilder ( $F_v/F_m$ ) sowie die daraus bestimmten  $F_v/F_m$ -Mittelwerte von Bergahornblättern (*Acer pseudoplatanus* L.) mit bzw. ohne Gallen der Ahorn-Gallmilbe (*Aceria macroryncha*).

Im Gegensatz dazu sind die in Pflanzengallen lebenden Larven der Gallwespen (Cynipiden) herbivor und ernähren sich vom Gallengewebe (REINKE 1999). Cynipide Gallen scheinen die Photosyntheseaktivität der Wirtsblätter sogar anzuregen (FAY *et al.* 1993), was als pflanzliche Kompensationsreaktion auf den Gewebeverlust interpretiert wird. Ein Stimulation der maximalen photochemischen Effizienz oder aber ihre Inhibierung konnte weder in den von Ulmenblattkäfer (*Xanthogaleruca luteola*) angefressenen Teilen von Feldulmenblättern (*Ulmus campestris*) noch in den benachbarten, intakten Bereichen festgestellt werden (**Bild 4**). Die oft beobachtete Inhibierung der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme nach Herbivorenbefall (WARRINGTON *et al.* 1989, FAY *et al.* 1993) könnte primär durch eine stomatare Limitierung hervorgerufen sein (WARRINGTON *et al.* 1989).



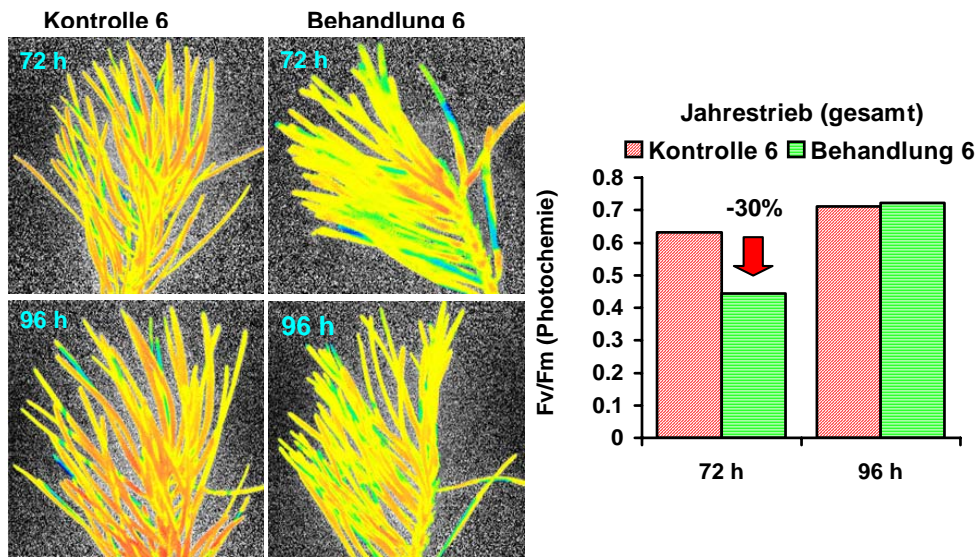
**Bild 4:** Falschfarbendarstellung der Chlorophyllfluoreszenzbilder ( $F_v/F_m$ ) sowie die daraus bestimmten  $F_v/F_m$ -Mittelwerte von unbelasteten bzw. von Ulmenblattkäfer angefressenen Feldulmenblätter

Aber nicht nur die Gallbildung oder der direkte Fraß auch die Oviposition kann pflanzliche Reaktionen induzieren (MEINERS & HILKER 2000). Bei *Pinus sylvestris* L. induziert die Eiablage der phytophagen Gemeinen Kiefernbuschhornblattwespe *Diprion pini* L. (Hymenoptera, Diprionidae) die Produktion von gasförmigen Phytohormonen (MEINERS & HILKER 2000), die Weibchen des spezialisierten Eiparasitoiden *Chrysonotomyia ruforum* Krausse (Hymenoptera, Eulophidae) anziehen (SCHRÖDER *et al.* 2005). *Pinus sylvestris*, *Diprion pini* und *Chrysonotomyia ruforum* stellen somit ein ideales tritrophisches Modellsystem dar, bei dem sich die vielfältigen Interaktionen Pflanze - Schädling - Nützling gezielt untersuchen lassen. Parallele Gaswechsellmessungen an Kiefernzweigen mit terminalen Abschnitten ohne Eiablage (systemische Reaktion) bzw. basalen Abschnitten mit und ohne Eiablage zeigten, dass  $CO_2$ -Aufnahme, Photosynthesekapazität und stomatäre Leitfähigkeit bei induzierten Zweigen systemisch verringert war. Diese Untersuchungen konnten nicht klären, ob die Änderungen des Primärstoffwechsels der Kiefer nach der Eiablage durch die Kiefernbuschhornblattwespe aufgrund einer spezifischen Wirkung auf Komponenten der Photosynthese ausgelöst wird oder ob die Verminderung der photosynthetischen Aktivität durch Chlorophyllabbau bedingt wird.



**Bild 5:** Chlorophyllfluoreszenzbilder ( $F_v/F_m$ ) sowie die daraus bestimmten  $F_v/F_m$ -Mittelwerte von unbelasteten (Kontrolle) und von nur im basalen Bereich durch die Oviposition der Gemeine Kiefernbuschhornblattwespe gestressten (Behandlung) Kiefernjahrestrieben

Die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zeigte deutlich, dass die Eiablage der Pflanzenwespe innerhalb kurzer Zeit eine vorübergehende, lokal begrenzte Reduktion der photosynthetischen Leistungsfähigkeit bewirkt (**Bild 5**). Eine signifikante Verminderung der maximalen photochemischen Effizienz um etwa 20% tritt nicht nur im direkt befallenen Zweigbereich auf. Die Reduktion der Photosyntheseeffizienz war nach etwa 72 Stunden maximal und wurde vor allem in den benachbarten nichtbefallenen Triebteilen deutlich. Das Ausmaß der Inhibierung der photosynthetischen Aktivität war hier um etwa 10% höher. Diese physiologische Reaktion war jedoch nicht anhaltend sondern wurde nach 3 Tagen zunehmend abgeschwächt (**Bild 6**). Diese Reversibilität sowie die Ergebnisse der maximalen Fluoreszenz ( $F_m$ ) schließen eine Verminderung der Photosyntheseeffizienz durch die Reduktion der Chlorophylldichte der Blätter aus und deuten auf eine direkt biochemische oder biophysikalische Beeinflussung dieses Primärstoffwechselweges.



**Bild 6:** Chlorophyllfluoreszenzbilder ( $F_v/F_m$ ) sowie die daraus bestimmten  $F_v/F_m$ -Mittelwerte von unbelasteten (Kontrolle) und von nur im basalen Bereich durch die Oviposition der Gemeine Kiefernbuschhornblattwespe gestressten (Behandlung) Kiefernjahrestrieben, gemessen nach 72 bzw. 96 Stunden

#### 4 Schlussfolgerung

Die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse stellt eine schnelle, nichtdestruktive und nicht-invasive Methode mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten bei der Untersuchung der physiologischen Reaktionen der Photosynthese von Laub- und Nadelbäumen auf Herbivorenbefall dar. Sie ermöglicht den Nachweis der Induktion der Pflanze durch die Eiablage eines phytophagen Insekts ebenso wie den Nachweis einer systemischen Reaktion innerhalb der Pflanzen. Es wurde gezeigt, dass Pflanzen in sehr unterschiedlicher Weise auf die unterschiedlichen Herbivoren mit spezifischen Veränderungen des Primärstoffwechsels (Photosynthese, photochemische Effizienz) reagieren. Auch die gleichzeitige Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Dynamik der pflanzlichen Reaktion ist mit einem relativ einfachen Ansatz möglich. Damit bietet sich die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse als relativ schnelle und einfache Methode an, um einen Befall durch Herbivore zu detektieren und das temporäre und lokale Ausmaß zu verfolgen und zu bewerten.

#### 5 Literatur

- COLAZZA S., FUCARINO A., PERI E., SALERNO G., CONTI E., BIN F. (2004):** Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *Journal of Experimental Biology* 207: 47-53
- FAY P.A., HARTNETT D.C., KNAPP A.K. (1993):** Increased photosynthesis and water potentials in *Silphium integrifolium* galled by cynipid wasps. *Oecologia* 93: 114-120

- HERPPICH W.B. (2001):** Einsatzmöglichkeiten der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse in der gartenbaulichen Forschung. Bornimer Agrartechnische Berichte 26: 91-104
- HERPPICH W.B. (2002):** Application potential of chlorophyll fluorescence imaging analysis in horticultural research. In: Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering. Proceedings of the 6th International Symposium (M Zude, B Herold, M Geyer, eds). Institut für Agrartechnik Bornim e.V., Potsdam: 609-614. ISBN 3-00-008305-7
- HERPPICH W.B., HETZ E., DAMMER K.-H., LANGNER H.-R., BEUCHE H., HELLEBRAND H.-J. (2005):** Einsatzmöglichkeiten der Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse zur Erkennung und Bewertung von pilzlichem Pathogenbefall. Bornimer Agrartechnische Berichte 40: 95-108
- MEINERS T., HILKER M. (2000):** Induction of Plant Synomones by Oviposition of a Phytophagous Insect. Journal of Chemical Ecology 26: 221-232
- NEDBAL L., TRTILEK M., HERPPICH W.B. (2000):** Methods and equipment for fluorescence imaging on plant material. Bornimer Agrartechnische Berichte 25: 127-135
- PFLANZENSCHUTZAMT BERLIN**  
[https://www.stadtentwicklung.berlin.de/pflanzenschutz/unternehmen/de/download/hinweise\\_erwerbsgartenbau\\_06\\_2004.pdf](https://www.stadtentwicklung.berlin.de/pflanzenschutz/unternehmen/de/download/hinweise_erwerbsgartenbau_06_2004.pdf)
- REINKE H.-D. (1999):** Ein Insekt bohrt die Pflanze an. Bauernblatt 10/1999: 16-17
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ C., LÓPEZ M.G., DÉLANO-FRIER J.P. (2006):** Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient spr2 tomato mutants favour oviposition by insect herbivores. Plant Cell and Environment 29: 546-557
- SCHRÖDER R., FORSTREUTER M., HILKER M. (2005):** A plant "notices" insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis. Plant Physiology 138(1): 470-477
- TURLINGS T.C.J., WÄCKERS F. (2004):** Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. In: Advance in Insect Chemical Ecology (RT Cardé, JG Millar, eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK
- VON WILLERT D.J., MATYSSEK R., HERPPICH W.B. (1995):** Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- WARRINGTON S., COTTAM D.A., WHITTAKER J.B. (1989):** Effects of insect damage on photosynthesis, transpiration and SO<sub>2</sub> uptake by sycamore. Oecologia 80: 136-139