



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



Schlussbericht zum Thema

„Entwicklung automatisierter Verfahren zur frühzeitigen Felddiagnostik des Falschen Mehltaus, *Plasmopara viticola*, für einen angepassten Pflanzenschutz im Ökoweinbau“

FKZ: 2815NA186

Projektnehmer/Projektnehmerin:

Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:

www.bundesprogramm.de
www.oekolandbau.de/forschung

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel.: 0228-6845-3280
E-Mail: boel-forschung@ble.de

Schlussbericht AuDiSens

Zuwendungsempfänger: Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof (JKI-ZR)
76833 Siebeldingen

Titel des Forschungsvorhabens

Entwicklung automatisierter Verfahren zur frühzeitigen Felddiagnostik des Falschen Mehltaus *Plasmopara viticola* für optimierte und reduzierte Pflanzenschutzanwendungen (AuDiSens)

Förderkennzeichen: 2815NA186

Laufzeit des Vorhabens: 09.11.2018 bis 31.07.2022

Kooperationspartner: Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau (JKI-OW)
Technische Universität Darmstadt (TU DA)

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Autoren: Rebecca Höfle, Dr. Katja Herzog, Prof. Reinhard Töpfer
Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für
Rebenzüchtung Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Germany;
katja.herzog@julius-kuehn.de, rebecca.hoefle@web.de

Kurzfassung

Das Verbundprojekt AuDiSens zielte auf die Evaluierung eines sensorgestützten Diagnoseverfahrens für den Falschen Mehltau der Rebe, *Plasmopara viticola*, mittels Hyperspektraltechnik und Künstlicher Intelligenz ab. Als Strategie für eine Früherkennung sollten Unterschiede hyperspektraler Reflexionsmuster von anfälligen und resistenten Rebsorten, hervorgerufen durch eine Infektion bzw. Abwehrreaktion mit Stilbensynthese in befallenen Blattgeweben, identifiziert werden. Es zeigte sich, dass die Verwendung von Blattscheiben zur Erfassung von Hyperspektralbildern am besten geeignet ist, um standardisierte Daten im Hochdurchsatz aufzunehmen. Es wurde ein standardisierter Versuch zur Stilbeninduktion mittels UV-C Bestrahlung etabliert, welcher u.a. für die Optimierung der HPLC-Referenzmethodik des Stilbennachweises genutzt wurde. Die Zeit für die HPLC-Analyse wurde von 25 Minuten auf 6 Minuten pro Probe verkürzt. Mit dem Ende des Verbundprojekts liegen nun umfassende, räumlich und zeitlich hochaufgelöste Hyperspektraldatensätze mit präzisen Referenzdaten vor, die nach Projektende für Forschungsprojekte oder Abschlussarbeiten zur Verfügung stehen. Darüber hinaus verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Erfassung des Mikroklimas in der Laubwand für eine möglichst genaue Prognose eines Infektionsrisikos mit *P. viticola* und damit auch das Ermöglichen einer zielgenauen Pflanzenschutzstrategie, unerlässlich ist. Die beiden Hauptfaktoren Blattnässe und Temperatur müssen für präzise Prognosen des Infektionsdrucks in Früherkennungs-Systeme integriert werden.

Summary

The major aim of AuDiSens was the evaluation of a sensor-based diagnostic tool in order to detect one of the most important pathogens in viticulture, downy mildew (*Plasmopara viticola*) using hyperspectral sensing and artificial intelligence. As strategy towards an early detection of downy mildew, differences of hyperspectral reflection patterns between susceptible and resistant grapevine varieties were analyzed, which might change due to an infection with the pathogen (susceptible) or defense reactions by stilbene synthesis (resistant). It was shown, that leaf disks are most suitable in order to acquire standardized, valid hyperspectral data with high-throughput. Further, a standardized UV-C treatment was established in order to artificially induce stilbene synthesis in the treated plant tissues. This system was used e.g. to optimize the HPLC-based detection and quantification of stilbenes. Regarding the HPLC, the time per sample was reduced from 25 to six minutes. With the end of the project, extensive, spatial and temporal high resolution hyperspectral image data sets with precise ground truth data can be provide for further research projects or master thesis. Furthermore, it could be shown that the recording of the grapevine's canopy microclimate is essential in order to predict the infection risk within vineyards and thus, is essential to implement a targeted plant protection strategy. Both, leaf wetness and temperature need to be implemented into an early detection tool.

I. Schlussbericht

1. Einführung

1.1 Gegenstand und Ziele des Vorhabens mit Bezug auf die Ziele des BÖLN

Das Projekt AuDiSens gehört zu den Förderprogrammen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) und dient der Nachhaltigkeitsstrategie der Bundesregierung, den Flächenanteil an ökologisch bewirtschafteter Landwirtschaft zu erhöhen und gleichzeitig, gemäß des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (NAP), den Einsatz von Kupfer-Präparaten im Ökoweinbau zu reduzieren. Hierfür sollte im Verbundprojekt ein sensorgestütztes, digitales Diagnoseverfahren evaluiert werden, auf dessen Basis eine neue Monitoring-Strategie für den Infektionsdruck im Weinberg entwickelt werden kann. Auf diese Weise können Prognosemodelle optimiert und somit ein Beitrag zur situationsbezogenen und teilflächenspezifischen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (PSM) geleistet werden.

Im Fokus des Projektes stand eine frühzeitige Erkennung des Falschen Mehltaus der Weinrebe (*Plasmopara viticola*). Eine solche sensorgestützte Früherkennung ermöglicht ein zeitlich und räumlich hochaufgelöstes Monitoring der Infektionsbedingungen in verschiedenen Umwelten und stellt daher einen wichtigen Schritt zu einem situationsgerechten Pflanzenschutz dar und trägt zu einem verbesserten Verständnis von Infektionsbedingungen und Krankheitsausbreitung bei. Die Erkenntnisse aus dem Projekt sollen u.a. bei der Weiterentwicklung von Prognoseverfahren für *P. viticola* dienen und die Entwicklung neuer Strategien für den Ökoweinbau mittels digitaler Monitoringtechnologien voranbringen.

Die sehr hohe Anfälligkeit traditioneller Rebsorten gegenüber dem Falschen Mehltau führt zu einem hohen Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (PSM) im Weinbau. Der hohe Krankheitsdruck durch die beiden Hauptschaderreger, dem Echten und Falschen Mehltau, benötigen im integrierten Weinbau, zwischen 8-12 Fungizid-Behandlungen und im Ökoweinbau eine wöchentliche Behandlung mit Kupferpräparaten (gegen Falschen Mehltau) und Schwefel (gegen Echten Mehltau). Dabei gilt im Ökoweinbau der Einsatz von Kupferpräparaten als bedenklich und liefert darüber hinaus insbesondere in regenreichen Jahren keinen zuverlässigen Schutz, da die Präparate durch Niederschläge schnell abgewaschen werden. Zum Erzielen einer weiteren Kupferreduktion im Ökoweinbau - bei gleichzeitiger Produktionssicherheit - besteht deshalb erheblicher Forschungsbedarf. Prognosesysteme für *P. viticola* gelten für anfällige Rebsorten und beruhen ausschließlich auf Wetterdaten sowie dem eingesetzten PSM. Mit den genannten Parametern lassen sich Sekundärinfektionen schwer voraussagen, wodurch häufig mehr PSM als notwendig zum

Einsatz kommen. Neue pilzwiderstandsfähige (PIWI-) Rebsorten bedürfen aufgrund ihres Resistenzlevels einen bis zu 80% reduzierten PSM Aufwand. Das Verbundprojekt AuDiSens setzt an diesem Punkt an und zielte auf die Entwicklung einer frühzeitigen Felddiagnostik von *P. viticola*. Frühzeitig bedeutet hierbei eine sensorgestützte Detektion einer Infektion bereits vor einer sichtbaren Symptom-Ausprägung. Die Umsetzung war stufenweise vom Labor über das Gewächshaus bis - im letzten Schritt - ins Freiland geplant. Mobile Hyperspektralsensoren, die zwischen gesunden und infizierten Blättern unterscheiden können, sollten für die Pathogendiagnostik angewendet werden, um auf dieser Basis das Risiko für Sekundärinfektionen objektiv und zuverlässig bewerten und den Bedarf von PSM einschätzen zu können. Im Fokus lag hierbei eine Unterscheidung des Resistenzniveaus verschiedener PIWI Rebsorten auf Basis von Stilbenkonzentrationen infolge einer Infektion mit *P. viticola*. Zum Erreichen des Ziels sollten hochauflösende Hyperspektralsysteme in Verbindung mit innovativen und modernsten Auswertelgorithmen eingesetzt werden. Ergänzend zu der (Früh-) Erkennung des Falschen Mehltaus, wurden flächenspezifische Temperatur- und Feuchtigkeitsdaten zur Beschreibung der Infektionsbedingungen in der Laubwand ermittelt.

1.2 Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt AuDiSens setzt sich aus den folgenden Arbeitspaketen (AP) zusammen:

| | | |
|-------|--|----------------|
| AP1 - | Epidemiologie von <i>P. viticola</i> auf PIWIs | (JKI-OW) |
| AP2 - | Sensordatenerfassung, Etablierung präziser Referenzdaten | (JKI-ZR) |
| AP3 - | Auswertung der Sensordaten | (TU DA) |
| AP4 - | Data mining | (TU DA) |
| AP5 - | Machbarkeitsstudie für Felddiagnostik | (alle Partner) |
| AP6 - | Wissenstransfer in die Praxis und Wissenschaft | (JKI) |

Im bearbeiteten AP 2 wurden am JKI-ZR sowohl Sensordaten (Hyperspektraldaten) mit dazugehörigen präzisen Referenzdaten (HPLC-MS-MS für Stilbenkonzentrationen in Blattmaterial) erhoben. Visuelle Krankheitsbonituren von inokulierten Pflanzen im Laborversuch bzw. von natürlich infizierten Freilandpflanzen sollten als weitere Referenz dienen. Die Sensordatenaufnahme erfolgte mittels Hyperspektralkamerasystem bestehend aus VNIR (Visueller und Nahinfrarotbereich, 400-1.000 nm) und SWIR (kurzwelliger Infrarotbereich, 1.000-2.500 nm). Sensordaten sollten hinsichtlich Symptomerkenkung (Ölflecken auf der Blattoberseite sowie sporulierender Pilzrasen auf der Blattunterseite) sowie zur Detektion einer infektionsbedingten Akkumulation von Stressmetaboliten im betroffenen Blattgewebe eingesetzt werden. Die hyperspektrale Datenaufnahme wurde zusätzlich mit den

von JKI-OW im Rahmen von AP 1 entwickelten und durchgeführten quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) referenziert. Die hohe Sensitivität der entwickelten Methode ermöglichte eine Quantifizierung des Pathogens und somit eine Charakterisierung des Infektionsgeschehens bereits in frühen Infektionsstadien, d.h. Stadien in denen noch keine visuellen Symptome sichtbar werden. Diese Daten sollten als zusätzliche Referenz für die Modellierung der Hyperspektraldaten in Bezug auf eine Früherkennung eingesetzt werden. Im Verlauf des Projektes stellte sich heraus, dass der Umfang der Sensordaten aufgrund der enorm hohen biologischen, aber auch technischen Varianz für eine Prognose mittels Verfahren der Künstlichen Intelligenz (KI, durch Partner TU DA) bei der Aufnahme ganzer Holzstecklinge unzureichend ist. Deshalb erfolgten die Hauptanalysen an Blattscheiben und nicht wie ursprünglich geplant an Blättern und Holzstecklingen aus dem Gewächshaus. Blattscheibentest garantierten homogenere, standardisierte Bedingungen während der Infektionsversuche, die Anzahl an Replikaten konnte damit um ein Vielfaches erhöht werden. Zusätzlich wurde eine KI-gestützte, objektive Krankheitsbonitur mittels mikroskopischer Einzelbilder der Blattscheiben (Zendler et al. 2021) als Referenz für die Hyperspektraldaten eingesetzt.

Die Aufnahme der Hyperspektraldaten im Freiland zur Detektion des Falschen Mehltaus im Weinberg erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit JKI-OW. In den dafür genutzten Flächen erfolgte im Austausch mit Projektpartner 2 auch die Erfassung der ortsspezifischen Temperatur- und Feuchtigkeitsdaten als Beitrag zur genaueren Modellierung der Epidemiologie des Falschen Mehltaus im Freiland. Abschließend sollte in einer Machbarkeitsstudie die Übertragung der im Labor identifizierten, hyperspektralen Unterschiede anfälliger und resistenter Rebsorten geprüft werden. Hierzu war geplant, das Hyperspektralkamerasystem zur Datenaufnahme mit der Feldphänotypisierungsplattform Phenoliner einzusetzen und die Daten im Teilprojekt TU-DA auf Übertragbarkeit der Krankheitsprognose zu evaluieren.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Plasmopara viticola gehört zusammen mit dem Echten Mehltau (*Erysiphe necator*) zu den beiden Hauptschaderregern im Weinbau. Bei unzureichender Bekämpfung führt *P. viticola* zu verheerenden Ertragsverlusten. Gleichzeitig steht dem Ökweinbau bis heute keine Alternative zum Einsatz von Kupferpräparaten zur Verfügung. Der Falsche Mehltau befällt alle grünen Reborgane, wobei junge Blätter und Gescheine besonders anfällig sind. Bei Gescheinen bzw. Beeren hält diese Empfindlichkeit an, bis die Spaltöffnungen durch Verkorkung zu Lentizellen werden. Die besonders hohe Anfälligkeit junger, grüner Beeren und des Stielgerüsts konnte von (Kennelly et al. 2005) gezeigt werden. Der starke Zuwachs in diesem Entwicklungsstadium begünstigt die Sekundärinfektionen mit *P. viticola* zusätzlich,

einerseits durch die erhöhte Anfälligkeit des Gewebes und andererseits durch den vom PSM noch nicht geschützten Zuwachs. Dies kann besonders gravierend in Jahren mit hohen Niederschlagsmengen sein, in denen PSM schnell abgewaschen werden. Um die beschriebenen Ertrags- sowie Qualitätsverluste im Ökoweinbau zu vermeiden und dabei die Nachhaltigkeit zu erhöhen, wurden die Mengen an Reinkupfer, die während der Vegetationsperiode ausgebracht werden, in den letzten Jahrzehnten von bis zu 50 kg Reinkupfer pro Hektar und Jahr auf die mittlerweile begrenzte Höchstmenge von 3 kg Reinkupfer pro Hektar und Jahr reduziert. In sehr regenreichen Jahren mit sehr hohem Infektionsdruck und erschwerten Bedingungen im Weinberg, wie 2016 und 2021, reichen diese Mengen nicht mehr aus, um gesundes Lesegut zu erzeugen. Ein Teil der Strategie zum reduzierten Einsatz von Kupfer im Ökologischen Weinbau und zur Reduktion des PSM-Einsatzes im integrierten Anbau bei gleichzeitig verbesserter Produktionssicherheit, stellt die Pflanzung von pilzwiderstandsfähigen Rebsorten (PIWIs) dar. Mit dem Anbau von PIWIs können bis zu 80% des PSM-Aufwands reduziert werden. Im Rahmen des Vorhabens sollten unter anderem die Epidemiologie von traditionellen und pilzwiderstandsfähigen Rebsorten verglichen werden. Dafür konnten auf eine bereits bestockte Fläche des JKI-OW Institutes zurückgegriffen werden. Die etablierte Parzelle wird in verschiedenen Kupfer Reduktionsvarianten ökologisch bewirtschaftet und konnte sowohl zur Erfassung der mikroklimatischen Daten (Temperatur und Feuchtigkeit innerhalb der Laubwand), also auch für die Bonitur nach EPPO Richtlinie und für die Erfassung von Sensordaten herangezogen werden. Das Vorhaben zielte auf eine sensorbasierte Frühdiagnostik des Infektionsgeschehen sowie eine sensorbasierte Charakterisierung von Resistenzantworten verschiedener PIWI Rebsorten ab. Eine solche Frühdiagnose kann als Werkzeug für das Infektionsmonitoring und damit zur verbesserten Krankheitsprognose in Abhängigkeit des Infektionsdrucks dienen und damit einen Beitrag zum situationsgerechten Pflanzenschutz und zum reduzierten Kupfereinsatz im Ökoweinbau beitragen. Hierfür bedarf es eines präzisen Verständnisses sowie der fundierten Erfahrung in der Forschung, wie sich resistente Rebsorten unter verschiedenen Bedingungen gegenüber dem Pathogen verhalten. Vereinzelt sind grundlegende Mechanismen der genetisch bestimmten Resistenzen bekannt. Unter anderem konnten die Phytoalexine, zu denen die bei der Rebe als Stressmetaboliten vorkommenden Stilbene gehören, als wichtige Bestandteile der induzierten Pathogenabwehr gezeigt werden (Schnee et al. 2008; Coutos-Thévenot et al. 2001; Godard et al. 2009; Jeandet et al. 2002). Die Akkumulierung bzw. die vorgelagerte Induktion der Stilbensynthese als Reaktion auf Pathogenangriffe, aber auch als Reaktion auf abiotische Stressfaktoren, wie UV-C Strahlung (Bai et al. 2019; Wang et al. 2013) ist in der Literatur beschrieben und wurden als potentielle Indikatoren für eine sensorgestützte Früherkennung ausgewählt und im Verbundprojekt AuDiSens untersucht. So wurden von Pezet et al. (Pezet et al. 2003; Pezet et al. 2004; Pezet

et al. 2015) Unterschiede in der fungiziden Wirkung auf *P. viticola* bzw. Hemmung der Zoosporen des Erregers, zwischen den induzierten Stilbenen in Folge einer Infektion festgestellt. Dabei stellten sich δ -Viniferin und Pterostilben als besonders fungitoxisch heraus (Pezet et al. 2003). Auch die Assoziation der induzierten Stilbensynthese mit resistenztragenden Rebsorten bzw. Genotypen ist in der Literatur beschrieben (Olivier et al. 2018). Sowohl für Kallose-Einlagerungen in den Spaltöffnungen als physikalische Barriere für eine Infektion, als auch Stilben-Akkumulierung im betroffenen Blatt- und Beerengewebe wird für den Resistenzlocus *Rpv10* beschrieben (Alonso-Villaverde et al. 2011; Wang et al. 2018). Es ist bisher nicht geklärt, welche Rolle der *Rpv3* Resistenzloci bei der Stilbensynthese einnimmt. Bisherige Studien zur Bestimmung der Stilbene als Biomarker für eine Pathogen-Abwehr Reaktion erfolgten vor allem durch die kosten- und arbeitsaufwendige HPLC- basierte Bestimmung der Stilben-Konzentration im Gewebe (Pezet et al. 2003; Olivier et al. 2018). Die Voraussetzung für eine sensorgestützte Früherkennung erfordert eine zerstörungsfreie Detektion einer Infektion mit Falschem Mehltau, was bereits mittels Fluoreszenzkamera (Cséfalvay et al. 2009), Thermokamera (Stoll et al. 2008) sowie Hyperspektralkamera (Oerke et al. 2016) an einzelnen Rebsorten exemplarisch gezeigt werden konnte. Die Studie von (Oerke et al. 2016) zeigt darüber hinaus, dass anfällige Rebsorten bei einer Infektion mit *P. viticola* ein anderes hyperspektrales Muster zeigen, als resistente Rebsorten. Dies zeigten deutliche Reflexionsunterschiede zwischen anfälligen und resistenten Rebsorten. Ausgehend von diesen Erkenntnissen zielte das Teilprojekt auf eine zerstörungsfreie Detektion und Charakterisierung von Infektionsgeschehen und Resistenzantworten auf Basis von Hyperspektralbildern ab. Zur Aufnahme entsprechender Hyperspektraldaten mit sehr hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung stand am JKI-ZR ein etabliertes Aufnahmesystem mit zwei Hyperspektralkameras zur Verfügung, mit denen die hyperspektrale Signatur in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 2.500 nm erfassbar war. Eine am JKI-ZR verfügbare Kartierungspopulation einer GF.GA-52-42 x Solaris-Kreuzung beinhaltet Nachkommen, die entweder *Rpv3*, *Rpv10*, beide Resistenzloci in Kombination oder keine der beiden Resistenzen tragen und wurde für Infektionsversuche unter kontrollierten Bedingungen genutzt. Bei der Erfassung der Stilben-Konzentrationen in Blattgeweben mittels HPLC, konnte an eine am JKI-ZR angewandte Methodik angeknüpft werden, welche ca. 30 Minuten pro Probe gedauert hat und die im Rahmen von AuDiSens optimiert werden sollte. Anhand dieser analytischen HPLC-, Bonitur- und qPCR-Daten sollten die Hyperspektraldaten für die zerstörungsfreie Detektion von Stilbenen sowie des Infektionsgeschehens referenziert werden, um diese als Indikatoren einer Infektion und somit als Basis für eine Frühdiagnose mittels Änderungen in der hyperspektralen Signatur anzuwenden. Zusätzlich zu den Infektionsversuchen und der vergleichenden Epidemiologie von anfälligen und resistenten Rebsorten in Zusammenarbeit mit JKI-OW, sollten parzellengenau zwei für eine Infektion mit *P. viticola* entscheidende

Umweltparameter, Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit, untersucht werden. Dafür wurden im Rahmen des Vorhabens Minidatenlogger angeschafft, die in der Laubwand positioniert wurden, um dort das Mikroklima und somit die Infektionsbedingungen zu erfassen. Es wird angenommen, dass das Mikroklima im Weinberg je nach Landschaftsstruktur, Anbausystem und Lage des Weinbergs von der nächstgelegenen Wetterstation abweicht und deshalb für eine weinbergsspezifische Krankheitsprognose essentiell sein könnte. Bisher nutzt das etablierte Prognosemodell "VitiMeteo" (Bleyer et al. 2008) für *P. viticola*, u.a. Temperatur- und Feuchtigkeitsdaten von Wetterstationen zur Krankheitsprognose. Es soll deshalb anhand der Minidatenlogger eine genaue Aufzeichnung des Mikroklimas erfolgen und geprüft werden, wie sich die lokalen Bedingungen innerhalb einer Wirtschaftsparzelle bzw. innerhalb der Laubwand unterscheiden.

3. Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Um die Infektionsantworten anfälliger und resistenter Rebsorten zu unterscheiden, wurden die traditionellen, anfälligen Rebsorten 'Riesling' (VIVC10077); 'Müller-Thurgau' (VIVC8141) und 'Weißburgunder' (VIVC9272) gewählt, sowie als resistente PIWI-Rebsorten 'Regent' (VIVC4572; *Rpv3.1*), 'Bronner' (VIVC17116; *Rpv3.3/Rpv10*), 'Calardis Musqué' (VIVC4549; *Rpv3.2*), 'Calardis Blanc' (VIVC22828; *Rpv3.1/Rpv3.2*), 'Cabernet Cortis' (VIVC20005; *Rpv3.3/Rpv10*) und 'Merzling' (VIVC4251; *Rpv3.3*). Darüber hinaus wurden die Eltern 'GF.GA-52-42' (*Rpv3.1*) und 'Solaris' (VIVC20340; *Rpv3.3/Rpv10*) der Kartierungspopulation untersucht sowie ausgewählte Genotypen aus deren Nachkommenschaft: 'Gf.2008-059-0177' (keine Resistenz), 'Gf.2008-059-0331' (*Rpv3*-Träger), 'Gf.2003-059-00002' (*Rpv10*-Träger), 'Gf.2008-059-0263' (*Rpv10*-Träger), 'Gf.2008-059-0329' (*Rpv10*-Träger), 'Gf.2008-059-0011' (*Rpv3/Rpv10*-Träger). Es wurden jährlich Holzstecklinge im Gewächshaus angezogen, welche entweder für die standardisierten Infektionsversuche als ganze Pflanzen oder zur Gewinnung von Blattscheiben genutzt wurden.

3.2 Kultivierung *P. viticola* unter kontrollierten Bedingungen

Für standardisierte Infektionsversuche wurde das Pathogen auf Holzstecklingen unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer vermehrt. Dazu konnte in Zusammenarbeit mit JKI-OWS ein System zur Vermehrung von *P. viticola* auf einjährigen Holzstecklingen der Rebsorte Müller-Thurgau optimiert werden. Das bereits am JKI – ZR vorhandene bzw. in der Vegetationsperiode 2019 im Freiland gesammelte Sporenmaterial (Mischprobe) wurde während der Projektlaufzeit kontinuierlich vermehrt und für die Herstellung von Inokulum genutzt. Dafür wurden die Blätter der Strecklinge in den Abendstunden mit einer Sporangiensuspension (100.000 Sporangien/ ml) besprüht, für die folgende Nacht

(mindestens 10 Stunden) in Dunkelheit und bei hoher Luftfeuchtigkeit (min 90 % rel. Luftfeuchte) inkubiert. Am Folgetag wurde die Abdeckung (zur Erzeugung der hohen Luftfeuchte) entfernt und die Stecklinge wurden im Gewächshaus bei konstanten Bedingungen (Nachttemperatur: 14 °C, Tagetemperatur 25 °C) und einer automatisch gesteuerten Tischbewässerung (mit zugesetzter Düngung) einmal täglich bewässert. Sieben Tage nach der Inokulation wurde die Stecklinge erneut für eine Nacht mit einer Folie abgedeckt, um die hohe Luftfeuchtigkeit nach einem Regenereignis zu simulieren und damit die geeigneten Bedingungen zur Sporulation des Pathogens zu schaffen. Die gebildeten Sporangien wurden am Folgetag nach dem Abtrocknen der Blätter mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und portionsweise bei -20 °C gelagert, um auf dieses zur gezielten Inokulation jederzeit zurückgreifen zu können.

3.3 Standardisierter Infektionstest an Holzstecklingen und Blattscheiben

Zur Durchführung der Blattscheibentests wurden jeweils das zweite bis vierte Blatt basipetal der Triebspitze von den einjährigen Stecklingen entfernt. Daraus wurden 12 Blattscheiben pro Rebsorte/ Zuchtstamm mit 1 cm Durchmesser mit Hilfe eines Korkbohrers gestanzt. Die Blattscheiben wurden in Zellkulturschalen (25 x 25 cm) auf 1%igem Wasseragar im von (Zendler et al. 2021) beschriebenen Muster (2 x 96 Blattscheiben pro Zellkulturschale) angeordnet. Die Blattscheiben wurden mit der Blattunterseite nach oben platziert.

Die gefrorenen Sporangien wurden in demineralisiertem und autoklaviertem Wasser suspendiert und eine Sporangienkonzentration von 100.000 Sporangien/ ml eingestellt. Zur Inokulation wurden entweder die jungen Blätter der Holzstecklinge mit der Sporensuspension eingesprüht oder jeweils 30 µl der Sporangiensuspension mittig auf die Blattscheiben aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über zehn Stunden in Dunkelheit bei einer Temperatur von 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 %. Danach wurde der Infektionstropfen mittels Wasserstrahlpumpe abgenommen. Zur Inkubation wurden die Holzstecklinge/Blattscheiben unter kontrollierten Bedingungen bei einem Tag-Nacht-Rhythmus mit 16 Stunden Licht und acht Stunden Dunkelheit bei 24 °C (Licht) und 22 °C (Dunkelheit) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % inkubiert.

3.4 UV-C Induktion der Stilbensynthese im Blattgewebe

In einem anderen Forschungsprojekt am JKI-ZR wurde gezeigt, dass die Stilbensynthese mit UV-C Bestrahlung im Labor induzierbar ist (Fröbel, unveröffentlicht). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Produktion von Stilbenen in der gesamten bestrahlten Blattfläche induziert wird und nicht nur punktuell durch die Infektion mit dem Pathogen. Aus diesem Grund wurde diese Methode zur Kalibrierung der HPLC-basierten Analyse der Stilbene sowie für die zerstörungsfreie Detektion mittels Hyperspektralkamera eingesetzt. Hierfür wurden Stecklinge

(2019) / Blätter (2020) und Blattscheiben (2021) für 20 Minuten mit UV- C ($\lambda = 254 \text{ nm}$) Licht im Labor bestrahlt und anschließend für 10 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Bestrahlung wurde unter einer Sterilbank durchgeführt, unter Verwendung der systemeigenen UV-C Bestrahlungseinheit (originärer Einsatz: zur Desinfektion der Flächen). Im Anschluss wurden die behandelten Blätter sowie nicht-behandelte Kontrollen für die Stilbenextraktion und –Quantifizierung genutzt.

3.5 Hyperspektraldatenerfassung (VNIR und SWIR)

Holzstecklinge und Blattscheibentests der Infektions- und UV-C-Versuche inkl. der nicht-behandelten Kontrollen wurden 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Inokulation/Induktion (hpi – hours post inoculation/induction) mit den Hyperspektralkameras aufgenommen. Eingesetzt wurde eine Hyperspektralkamera, die das Reflexionsspektrum von 1.000 – 2.500 nm erfasst (HySpex SWIR 384, Norsk Elektro Optikk A/S, Skedsmokorset, Norwegen). Die für das Vorhaben geplante Erfassung des Reflexionsspektrums von 400 – 1.000 nm (VNIR) konnte auf Grund technischer Probleme bis zum vollständigen Defekt der Kamera ab der Versuchssaison 2020 nicht erfolgen. Eine Ersatzkamera war nicht verfügbar.

Aufnahmen mit der SWIR-Kamera erfolgten standardisiert in einer Aufnahmebox, in der die Kamera, die Beleuchtungseinheiten, das Spektralon (= Weißreferenz) und das Messobjekt (Blattscheibentests und Holzstecklinge) stets gleich angeordnet sind (siehe Abb. 1). Damit konnte ein konstanter Mess – und Beleuchtungswinkel sichergestellt werden und damit eine gleichbleibend hohe Bildqualität erreicht werden. Im Projektverlauf wurde der Messaufbau aufwendig optimiert. Dazu gehörte auch eine Umstellung des Abstandes zwischen Messobjekt und Kamera von 100 cm auf 30 cm in 2021. Durch den geringeren Abstand der Kamera zur Pflanze konnte die Bildauflösung deutlich verbessert werden.

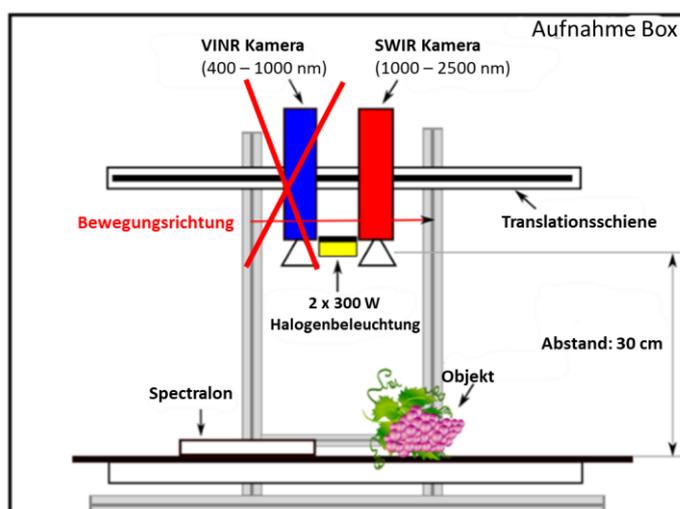


Abb.1: verändert nach (Bendel et al. 2020a): Aufbau der Hyperspektralmesseinheit am JKI-ZR. Der Abstand zwischen Hyperspektralkamerasystem und Objekt (Blattscheibentests) wurde auf 30 cm reduziert und somit die Auflösung des Objekts, insbesondere die Blattscheibe, im Bild verbessert.

3.6 Referenzdatenerfassung

3.6.1 Visuelle Bonitur des Infektionsgeschehens (Blattscheiben/ Stecklinge)

Das Infektionsgeschehen auf den Blattscheiben/Holzstecklingen wurde 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Inokulation (hpi – hours post inoculation) manuell bonitiert. Hierfür wurden sowohl Stecklinge (2020/2021) sowie Blattscheiben (2022) genutzt und der Befall in 5 Klassen eingeordnet (Klasse 1 = ohne Befall bis Klasse 9 = sehr starker Befall). Als Referenz für die mikroskopischen Aufnahmen erfolgte die Referenzbonitur qualitativ (sichtbare Reaktion = 1; keine Reaktion = 0) sowie quantitativ, d.h. die von der Reaktion betroffenen Blattfläche wurde in Prozent (%) geschätzt. Dabei wurde zwischen Ausbildung von Sporangioophoren (Bildung des typischen weißen Sporenbelags auf der Blattunterseite) und Resistenzreaktionen des Blattgewebes unterschieden. Diese Boniturdaten wurden zur Referenzierung der Sensordaten sowie der Stilben-Analysen genutzt.

3.6.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)

Zur Analyse des Stilbengehalts im Blattgewebeextrakten wurde das Verfahren der HPLC-MS/MS eingesetzt. Diese biochemische Analysemethode dient der Identifikation, Quantifizierung, Reinigung und Trennung von Substanzen. Als Detektor wurde ein Tandem-Massenspektrometer verwendet. Für die Probenahme wurden ca. 6 mg Blattmaterial (unzerkleinerte Blattscheiben) zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Extraktion bei – 70 °C aufbewahrt. Die Blattextraktion erfolgte v.a. in der Herbst- / Wintersaison 2021. Hierfür wurde das am JKI-ZR verfügbare Protokoll (Pezet et al. 2003) zunächst optimiert. Dies umfasste alle Schritte der Probenvorbereitung, -Aufarbeitung und Extraktion sowie die Einstellungen der HPLC-Analyse. Für die Extraktion wurden die tiefgefrorenen Blattscheiben in 100 µl Methanol für 10 Minuten unter Schütteln bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Eisbad abgekühlt (Kondensation) und drei Minuten bei 13.000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und in HPLC Vials mit Inlet überführt. Den Extrakten wurde Hydroxystilben mit definierter Konzentration als interner Standard für die Analysen zugesetzt. Die Analyse erfolgte unmittelbar im Anschluss mittels HPLC-MS/MS. Zur Konzentrationsbestimmung wurde der interne Standard als Referenz benutzt und die Stilbenkonzentration pro g Blattgewicht bestimmt.

3.6.3 KI-gestützte Krankheitsbonitur mittels mikroskopischer Einzelbilder

Die automatisierte Bildaufnahme und –Auswertung erfolgte mit Hilfe eines am JKI – ZR entwickelten Systems (Zendler et al. 2021). Hierfür wurde von jeder Blattscheibe ein Einzelbild pro Zeitpunkt aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten für alle Blattscheiben einheitlich mit

einer 10.5-fachen Vergrößerung und in einheitlicher Größe von 2752 x 2208 Pixel pro Bild. Diese Einzelbilder wurden zusätzlich manuell auf den Befall mit *P. viticola* bonitiert.

3.6.4 Quantifizierung des Befalls mittels quantitativem PCR Nachweis

Im Rahmen des Vorhabens wurde vom Projektpartner (JKI-OW) die Methode des quantitativen PCR (qPCR) Nachweises des Falschen Mehltaus im Blattgewebe weiterentwickelte, optimiert und etabliert (siehe Schlussbericht JKI-OW). Der qPCR- basierte Nachweis erfolgte in 2021 an vier Infektionsversuchen mit den in Tabelle 2 genannten Rebsorten (siehe Schlussbericht JKI-OW). Im Vorfeld wurden von den Blattscheiben, die für die Probennahme der qPCR genutzt wurden, Hyperspektral- und mikroskopische Bilder aufgenommen mit dem Ziel, die quantitativen PCR-Daten als Referenz für die erhobenen Hyperspektraldaten zu nutzen.

Tab. 2: Rebsorten und Zuchtstämme mit unterschiedlicher Anfälligkeit bzw. Resistenz gegen *P. viticola*, für die SWIR- Reflexionsdaten und zur Referenzierung in Zusammenarbeit mit JKI-OW die Quantifizierung des Infektionsgeschehens mittels qPCR erfolgen konnte

| Rebsorten | Resistenz-Gen |
|---|----------------------|
| Müller-Thurgau, Riesling, Weißburgunder | - |
| Gf.2008-059-0331 | Rpv3 |
| Regent, GF.GA-52-42 | Rpv3.1 |
| Calardis Musque | Rpv3.2 |
| Merzling | Rpv3.3 |
| Calardis Blanc | Rpv3.1/Rpv3.2 |
| Kaberam, Severnyi | Rpv10 |
| Gf.2008-059-0002, Gf.2008-059-0263 | Rpv10 |
| Cabernet Cortis, Solaris | Rpv3.3/Rpv10 |

3.9 Machbarkeitsstudie zur Detektion von Infektionen mit *P. viticola* im Feld

Das Projekt zielte abschließend darauf ab, die Übertragbarkeit identifizierter Unterschiede spektraler Signaturen von infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial im Feld zu prüfen. Hierfür wurde das Hyperspektralkamerasystem in 2020 auf die am JKI-ZR verfügbare Feldphänotypisierungsplattform Phenoliner montiert und - in Abstimmung mit dem Projektpartner JKI-OW parallel zur visuellen Krankheitsbonitur - von den Rebsorten 'Regent', 'Weißburgunder', 'Spätburgunder' und 'Grauburgunder' ('Ruländer'), jeweils Hyperspektraldaten in den beiden unterschiedlichen Pflanzenschutzvarianten (100 % mit Kupfer behandelt und 50% reduzierter Pflanzenschutz), aufgenommen. Die Referenzbonituren wurden gemäß der EPPO (European and Mediteranean Plant Protection Organisation) Richtlinie durchgeführt. Infolge dieser ersten Datenaufnahme traten erste Störungen an der VNIR-Kamera im Labor-Messsystem auf. Die zweite Datenaufnahme im Weinberg 2021 führte zum defekt der VNIR-Kamera, der trotz mehrfacher Kontraktaufnahme mit der Herstellerfirma bis zum Projektende nicht behoben werden konnte.

3.10 Erhebung ortsspezifischer Temperatur- und Feuchtigkeitsunterschiede

Datenlogger (Hygro Button, Plug & Track, Proges Plus, Willems, Frankreich) zur lokalen Temperatur- und Feuchtigkeitserfassung wurden u.a. in Rückkopplung zu Projektpartner 2 (JKI-OW) in der ökologisch bewirtschafteten Flächen in der Laubwand angebracht. Die Datenlogger erfassen dabei im Abstand von 30 Minuten die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit.

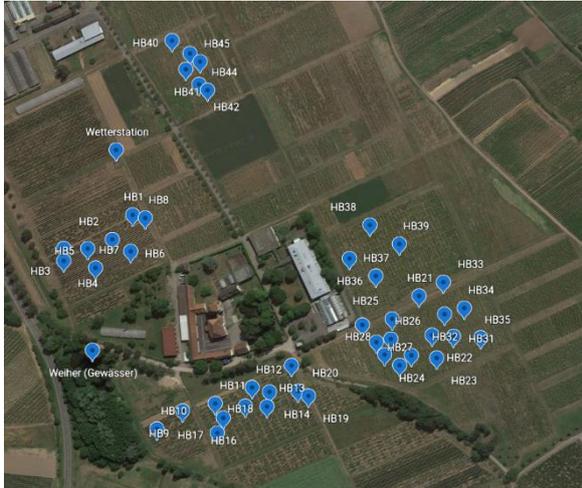


Abb. 2: Standorte der Hygrobuttons in den Versuchsflächen des JKI Geilweilerhof Siebeldingen

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und Diskussion

4.1 Sensordatenerfassung

Zunächst wurden Hyperspektraldaten von Holzstecklingen zur KI-basierten Detektion durch Projektpartner 3 (TU-DA) von Infektionen bzw. Resistenzantworten aufgenommen. Die Datenübermittlung an TU-DA und somit auch die Datenauswertung erfolgte aus logistischen Gründen am Ende einer Versuchssaison, d.h. das erste Mal Ende 2019. Bei der Auswertung wurden enorme Reflexionsunterschiede in einem Hyperspektralbild innerhalb einer aufgenommenen Pflanze festgestellt, die nicht auf eine unterschiedliche Behandlung zurückzuführen waren (wie z.B. die Blätter einer nicht-behandelten Kontrolle in Abb. 2A). Aus diesen wichtigen Erkenntnissen wurden weitere Aufnahmemodalitäten angepasst. Dafür erfolgte die Datenaufnahme auch an abgetrennten Blättern. Dennoch konnte auch dadurch die Variabilität der hyperspektralen Signatur (Reflexionsmuster) innerhalb eines Blattes nur minimal reduziert werden. Ursächlich für diese Variabilität könnte die Tatsache sein, dass auch abgetrennte Blätter nicht flach während der Datenaufnahme aufliegen. Dadurch entstehen zwangsläufig Geometrie-bedingte Unterschiede in der Beleuchtung und folglich auch in der aufgenommenen Reflexion. Schlussfolgernd wurden alle Versuche (d.h. UV-C- induzierte Stilbensynthese und Infektionsversuche mit *P. viticola*) in der Versuchssaison 2021 an Blattscheiben durchgeführt, um möglichst homogene Bedingungen zu schaffen und die Probenanzahl pro Genotyp um ein Vielfaches zu erhöhen. Abbildung 2 zeigt die

Reflexionsunterschiede zwischen den Blättern einer Pflanze und im Vergleich dazu die Unterschiede zwischen aufgenommenen Blattscheiben derselben Pflanze/ Blätter.

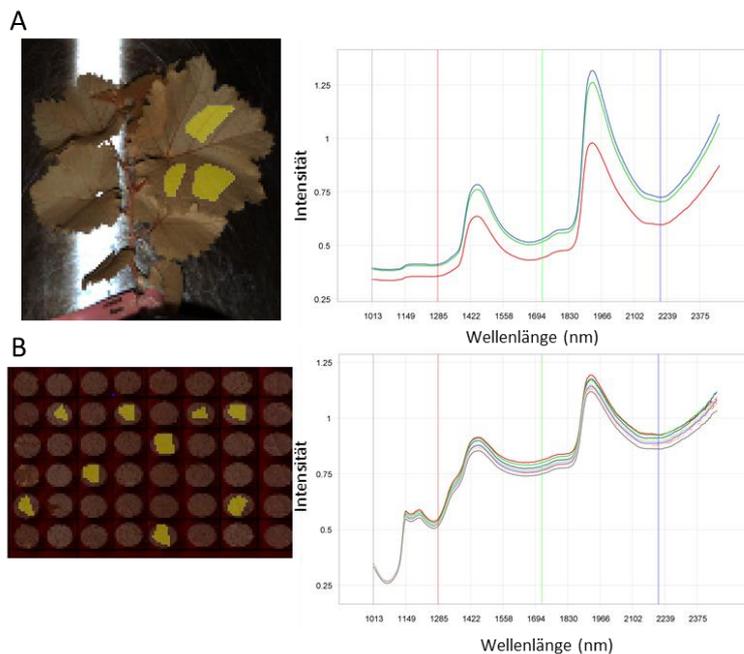


Abb.2: A: Unterschiede in der spektralen Reflexion innerhalb eines Holzstecklings zum Zeitpunkt t_0 , bedingt durch unterschiedliche Blattgeometrie (Blätter haben keine glatte, einheitliche Oberfläche; Blätter einer Pflanze stehen auch immer in unterschiedlichem Winkel zur Sprossachse, dies führt letztlich zu Variationen bei der Beleuchtung und somit auch zu Variationen im spektralen Reflexionsmuster). B: Spektrale Unterschiede zwischen Blattscheiben einer Rebsorte zum Zeitpunkt t_0 .

Von den ausführlichen Versuchsreihen zur UV-C induzierten Stilbensynthese und zur Inokulation mit *P. viticola* konnte die Reflexion im SWIR-Bereich (1.000 – 2.500 nm) des elektromagnetischen Spektrums aufgenommen werden. Der kurzwellige Nahinfrarot Wellenlängenbereich (SWIR) enthält wichtige Informationen zum Wasserstatus des Pflanzengewebes und lässt Rückschlüsse auf die biochemische Zusammensetzung zu (Carter und Knapp 2001). Während die Reflexion von Blattgewebe im Bereich des sichtbaren Lichts (VIS: 450-700 nm) vor allem von der Pigmentzusammensetzung und dabei hauptsächlich vom Chlorophyll bestimmt wird, hängt die Reflexion des Blattgewebes im Nah-Infrarot Bereich (NIR: 700 – 1.000 nm) hauptsächlich von der Zell – und Gewebestruktur ab (Blackburn 2007). Mit der Aufnahme der SWIR – Daten konnte eine wichtige Grundlage geschaffen werden, um nach Anwendung moderner KI- basierter Analyse – Algorithmen, die Detektion von Stilbenen als Indikatoren für einen Befall mit *P.viticola* zu ermöglichen. Damit geht aus dem Vorhaben eine wichtige Datengrundlage hervor, die die Detektion und ggf. auch die Unterscheidung verschiedener Resistenzantworten – in Abhängigkeit von der genetischen Resistenz (Rpv3 oder Rpv10) ermöglichen kann. Vor allem für eine Früherkennung spielen biochemische Veränderungen, die mit dem menschlichen Auge nicht sichtbar sind, eine wichtige Rolle, die Akkumulierung der Stilbene zählt zu den frühen Pathogen-induzierten biochemischen

Veränderungen. Auch für eine mögliche Früherkennung einer Infektion mit dem Falschen Mehltau könnte sich die Reflexion im SWIR – Bereich eignen. (Bendel et al. 2020b) konnten die Möglichkeit einer Früherkennung einer Infektion mit dem Esca-Komplex in einer Freilandanwendung mittels Analyse der SWIR-Reflexion zeigen.

4.2 Visuelle Bonitur des Infektionsgeschehens bzw. der Resistenzreaktionen

Die Boniturdaten dienen der Gruppierung der einzelnen Rebsorten, abhängig von ihren bekannten genetischen Resistenzen, sowie als Datengrundlage für die Referenzierung der Hyperspektraldaten. Zwischen den untersuchten Rebsorten konnten 24 und 48 Stunden nach der Inokulation keine statistischen Unterschiede (Anova, F-Test auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, siehe Abbildung 3) gezeigt werden. Diese Bild setzt sich auch nach 72 und 96 Stunden fort. Mit dem Unterschied, dass die Resistenz- und Infektions-Symptomausprägungen in ihrer Quantität insgesamt zunehmen. Der in Abb. 3 hervorgehobene Zeitpunkt (72 Stunden nach Inokulation mit *P. viticola*) wird in der Literatur als wichtiger Zeitpunkt in der Resistenzreaktion beschrieben (Gindro et al. 2006; Pezet et al. 2015; Pezet et al. 2003), zu dem die Stilbenkonzentrationen im betroffenen Blattgewebe ihren Maximalwert erreichen. Deshalb ist eine sichere Referenzierung entscheidend für die korrekte Interpretation der chemischen und spektralen Analysen. Aus diesem Grund erfolgte eine manuelle Bonitur anhand der erhobenen Mikroskopiebilder, sowie die visuelle Klassifikation der Reaktion (Sporangienbildung – vgl. MTH 96 hpi oder Resistenzantwort – vgl. Regent oder Solaris). In Abbildung 3 sind aus diesem Grund beispielhaft für die jeweilige Gruppe (keine Resistenz, Rpv3 und Rpv10) entsprechende Blattscheiben mit typischen Symptomen dargestellt. Bei der quantitativen Erfassung der Symptome wurde die Art der Reaktion ebenfalls in drei Kategorien miterfasst (1: Bildung Sporangiothoren, 2: Resistenzreaktion, Resistenzreaktion und Bildung Sporangiothoren). Diese Referenzdaten bildet eine wichtige Grundlage für weitere Auswertungen der Sensordaten nach Projektende, beispielsweise im Rahmen einer Abschlussarbeit an der TU-DA oder am JKI-ZR. Die KI-basierte Krankheitsbonitur ist darüber hinaus als Referenz für die analytische Stilbenanalyse nutzbar. Die Bilddatensätze können hierbei auch Aufschluss über die Varianzen in der Symptomausprägung innerhalb einer Rebsorte und innerhalb einer Wiederholung geben.

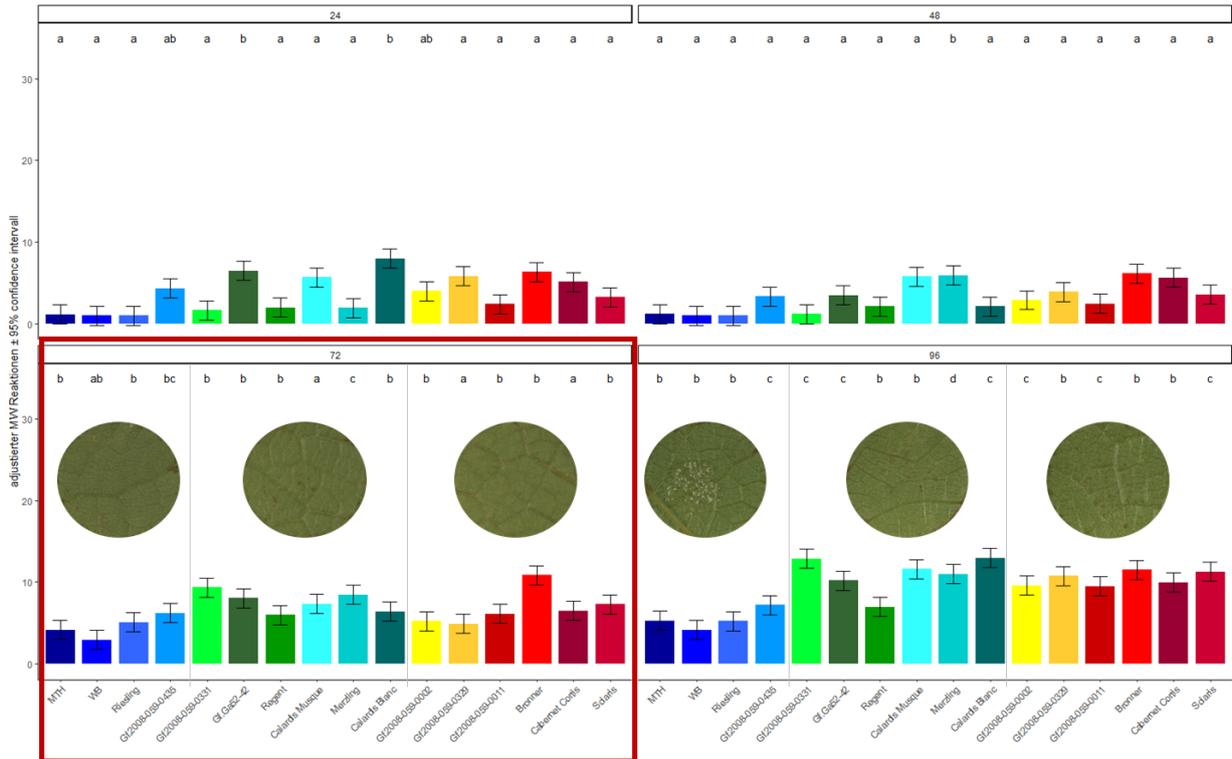


Abb. 3: Infektionsverlauf/ Resistenzreaktion auf den Blattscheiben mittels visueller Bonitur der Mikroskopiebilder 24; 48, 72 und 96 Stunden nach der Inokulation (hpi): Unterschiede gemäß Anova (F-Test, Signifikanzniveau $p < 0,05$ mit Buchstaben gekennzeichnet und 95 % Konfidenzintervall. MTH = Müller-Thurgau, WB = Weißburgunder.

Weiterhin konnten im Verlauf des Vorhabens die Bedingungen für die Infektionstests mit *P. viticola* kontinuierlich weiterentwickelt und optimiert werden, was eine bedeutende Grundlage für die präsymptomatische Erkennung einer Infektion mit dem Falschen Mehltau darstellt. Die ursprünglich geplanten Infektionsversuche an Holzstecklingen unter Gewächshausbedingungen zeigten jedoch hohe Fehlerquelle bei der Identifikation signifikanter Reflexionsmuster (siehe 4.1) und ermöglichten nur eine geringe Anzahl Wiederholungen. Daraus ging die beschriebene Umstellung des Versuchssystems auf Blattscheibentests hervor. Durch die Verwendung von Blattscheiben konnte neben den besser kontrollierbaren Versuchsbedingungen auch ein deutlich höherer Stichprobenumfang erzielt werden. Damit sind die Ergebnisse als statistisch fundierter anzusehen als bei den geringeren Stichprobenumfängen (auf Grund von Kapazitätsgrenzen) beim Versuchsaufbau mit Stecklingen als Versuchspflanzen.

4.4 Stilbendetektion und Machbarkeitsstudie der Früherkennung einer Infektion mit *P. viticola*

Die beschriebenen Optimierungen der Bedingungen für die Erzeugung des Pflanzenmaterials und insbesondere für die Durchführung der Infektionsversuche mit dem Falschen Mehltau und der Hyperspektraldatenaufnahme wurden im stetigen Austausch und unter Nutzung einer

Auswertesoftware (Breeze, Prediktera, Umeå, Sweden) durch die Datenanalyse und Bewertung begleitet. Zur Etablierung des Versuchs- und Aufnahmesystems wie es in der Versuchssaison 2020/2021 angewandt wurde, waren zunächst Versuchsreihen nötig, die der Weiterentwicklung und Optimierung des Versuchssystems dienten, um aussagekräftige, repräsentative und valide Sensordaten aufzunehmen. Der hierbei aufgewendete Zeitumfang war aufgrund der technisch herausfordernden Aufnahmetechnik des Hyperspektralsystems wesentlich höher als ursprünglich angenommen. Dabei hat sich gezeigt, dass der Probenumfang eine hyperspektrale Detektion von Stilbenen im Blattgewebe, bzw. ein Infektionsgeschehen bei anfälligen Rebsorten bei Holzstecklingen aufgrund der in 4.1 beschriebenen Varianz der spektralen Reflexionsmuster mit dem analysierten Probenumfang nicht ausreichend hoch war. Dies zeigte sich bei der Sensordatenanalyse durch den Projektpartner TU-DA. Neben personellen Kapazitätsgrenzen, steht auch in den Gewächshäusern, in denen die Bedingungen standardisiert sind, nicht ausreichend Platz zur Verfügung für die notwendige Anzahl an Stecklingen. Das Hyperspektralkamerasystem ist darüber hinaus als Zeilensystem sehr langsam, wodurch eine Steigerung des Probenumfangs nicht möglich war. Eine Lösung hierfür würde ein anderes Hyperspektralsystem, z.B. eine One-Shot-Kamera darstellen, die im Projekt jedoch nicht verfügbar war. Als Lösung zur deutlichen Erhöhung der Wiederholungen pro Genotyp wurde das Versuchssystem auf Blattscheibentests umgestellt. Damit wurden Datensätze erzeugt, die zu statistisch fundierten Aussagen führen können.

Im Rahmen des Projektes konnte das Hyperspektral – Aufnahmesystem für Blattscheibentests weiter angepasst und für künftige Vorhaben, die an diese Arbeiten anknüpfen etabliert werden. In Aufnahmetests hat sich in Abstimmung mit dem Projektpartner TU-DA ergeben, dass der verringerte Abstand von Kameralinse und Blattscheiben insbesondere bei den Aufnahmen mit der SWIR-Kamera eine geeignete Aufnahmemethode darstellt, mit der die technisch bedingte niedrigere räumliche Auflösung der SWIR Kamera (im Vergleich zur VNIR Kamera, die allerdings ab der Versuchssaison 2020 nicht mehr zur Verfügung stand) ausgeglichen werden kann. Somit konnten in der Versuchssaison 2021 sechs repräsentative Hyperspektraldatensätze erzeugt werden, deren Auswertung aufgrund fehlender HPLC-Referenzdaten und einem früheren Laufzeitende der TU-DA im Rahmen des Vorhabens nicht mehr realisiert werden konnte. Alle bereits im Vorfeld mit dem Projektpartner TU-DA abgestimmten Maßnahmen und Anpassungen bei der Datenaufnahme führten letztendlich zu einer guten Datenlage zur Entwicklung einer Auswerteroutine, die z.B. im Rahmen einer Abschlussarbeit umgesetzt werden kann. Die im Rahmen des Projekts erhobenen Daten stellen somit einen wichtigen Baustein für die Entwicklung eines Hyperspektraltools zur Erkennung des Falschen Mehltaus dar.

4.5 UV-C Induktion Blattscheibentests

Die sensorgestützte, zerstörungsfreie Detektion der Stilbenakkumulation in befallenem Blattgewebe wurde im Rahmen des Verbundprojekts als essentieller Baustein der Frühdiagnose analysiert. Hierbei steht und fällt die Leistungsfähigkeit eines Prognosemodells mit der Qualität der Referenzdaten. Parallel zur Etablierung der sensorgestützten Methode, musste zunächst auch die HPLC-MS/MS zur Stilbendetektion und –Quantifizierung weiterentwickelt, optimiert und etabliert werden. Hierfür erfolgten zahlreiche Voruntersuchungen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Voruntersuchungen stellte die fehlerhafte Reproduzierbarkeit des HPLC-basierten Stilbennachweises in den Infektionsversuchen mit Falschem Mehltau dar. Um die Ziele des Projektes AuDiSens zu erreichen, erfolgte die Etablierung der Stilben-Detektion an Blattscheiben, die mit UV-C Licht bestrahlt wurden, um die Synthese der Stilbene anzuregen. Die Ähnlichkeit der Stressantwort auf UV-C Strahlung und der Resistenzantwort ist in der Literatur beschrieben (Douillet-Breuil et al. 1999; Bai et al. 2019). Bei UV-C Licht ($\lambda = 354 \text{ nm}$) handelt es sich um sehr energiereiche elektromagnetische Strahlung, die starke Gewebeschäden auslöst, das stellt einen gut kontrollierbaren und sehr ausgeprägten Stressreiz dar, der im Vergleich zu den lokal sehr begrenzten Resistenzantworten nach Inokulation mit *P. viticola* großflächig im gesamten Blattmaterial auftritt. Beide Systeme (Hyperspektral und HPLC) wurden deshalb zunächst mit dem UV-C-induzierten Blattmaterial kalibriert mit dem Ziel, Stilbene in geringeren Konzentrationen als Reaktion auf einen Befall mit *P. viticola* zu detektieren. Abb. 4 zeigt exemplarische die Konzentration von Resveratrol und den beiden Dimeren von Resveratrol δ - und ϵ -Viniferin. Als anfällige Kontrolle wird Riesling dargestellt. Repräsentativ für die Zuchtstämme und Rebsorten, die *Rpv3*-Träger sind, sind die Stilbengehalte vom Zuchtstamm GF.GA-52-42 dargestellt, der gleichzeitig auch ein Elter der im Vorhaben untersuchten Kartierungspopulation darstellt. Ebenfalls als Elter und repräsentativ für die *Rpv10* tragenden Zuchtstämme und Rebsorten sind die Stilben-Konzentrationen für Solaris dargestellt. Betrachtet man die Konzentration des wohl bekanntesten Stilbens der Rebe, dem Resveratrol, zeigt sich das zu erwartende Bild: Alle drei Rebsorten zeigen eine deutliche Akkumulierung in den ersten 48 Stunden nach dem UV-C Stressreiz. Der höchste Wert wurde in Blattscheiben des *Rpv3* Trägers festgestellt, mit $175 \mu\text{g/g}$ Blattfrischgewicht 24 Stunden nach der UV-C Bestrahlung. Auch in Blattscheiben des *Rpv10* Trägers Solaris wurden Werte über 150 mg/g Blattfrischgewicht festgestellt, allerdings erst 48 Stunden nach der UV-C Bestrahlung. Auch in der anfälligen Kontrolle konnte eine Resveratrol-Akkumulierung festgestellt werden, allerdings liegen die Werte deutlich unter den beschriebenen Werten für die resistenten Rebsorten. Die Resveratrol-Konzentration nimmt tendenziell ab 72 Stunden nach dem Stressreiz wieder ab. Dieser Effekt zeigt sich bei allen dargestellten Rebsorten. Gleichzeitig mit der Abnahme der Resveratrol-Konzentration, wurde ein stetiger Anstieg der Konzentration sowohl an δ -, als

auch an ϵ -Viniferin (den beiden oligomeren Derivaten) in den resistenten Rebsorten beobachtet. Auch im anfälligen Riesling wurde ein Anstieg der Konzentration der beiden Viniferine beobachtet, jedoch in weitaus geringerem Ausmaß. Die schnelle Reaktion und damit verbundenen Akkumulierung der Viniferine in Blattscheiben der Rebsorten GF.GA-52-42 und Solaris entspricht den in der Literatur beschriebenen Stressreaktion nach einer Infektion mit *P. viticola* (Olivier et al. 2018; Pezet et al. 2015; Eisenmann et al. 2019).

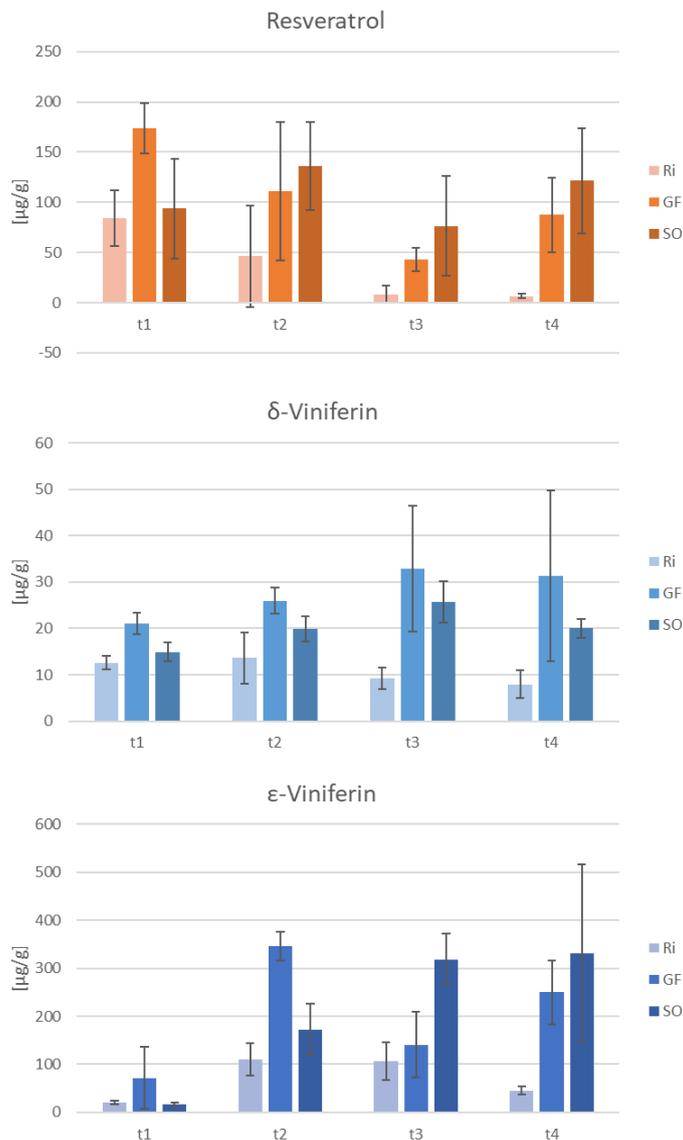


Abb.4: Stilben-Konzentration ($\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) an t1 = 24 hpi, t2 = 48 hpi, t3 = 72 hpi und t4 = 96 hpi. Konzentration und Standardabweichung für Resveratrol, δ - und ϵ - Viniferin der Rebsorten Riesling (Ri), GF.GA-52-42 (GF) und Solaris (SO). hpi – Stunden nach der Induktion mit UV-C.

Ob die detektierten Unterschiede ausreichend hoch und das eingesetzte Hyperspektralsystem ausreichend auflösend und somit sensitiv für die Erkennung unterschiedlicher Reflexionsmuster sind, kann abschließend nicht bewertet werden. Die sehr hohen Erkennungsgenauigkeiten der KI-basierten Prognose (siehe Schlussbericht TU-DA) lassen jedoch den Schluss zu, dass die Blattscheiben unterschiedlicher Rebsorten und somit

Rebsorten mit unterschiedlichen Resistenzniveau signifikante Unterschiede in ihren Reflexionsmustern im Verlauf der Infektion zeigen und diese zur Frühdiagnose möglicherweise nutzbar sind. Ob diese Reflexionsunterschiede jedoch auf unterschiedliche Stilbenzusammensetzungen und –Konzentrationen in den betroffenen Blattgeweben zurückzuführen ist, muss über das Projektende hinaus überprüft werden.

4.4 Aufnahme präziser Temperatur- und Feuchtigkeitsdaten

Mittels der beschafften Hygrobuttons wurden die Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen in der Laubwand der untersuchten Parzelle aufgezeichnet und mit denen der nächsten Wetterstation (Geilweilerhof) verglichen. Die Temperatur- und Feuchtigkeitsverläufe in den Laubwänden (Hygrobuttons) unterscheiden sich von denen der Wetterstation am Geilweilerhof teils deutlich. Im Vergleich zur Wetterstation konnten in der untersuchten Versuchsparzelle erneut höhere Spitzentemperaturen erfasst werden. Am heißesten Tag während der Aufzeichnungen (18.06.2021) verzeichnete die Wetterstation um 15.00 Uhr eine Temperatur von 32 °C, während die Temperaturen in der Laubwand zur selben Zeit in der ökologisch bewirtschafteten Parzelle 36,8 °C betrug. Bei den Nachttemperaturen und damit den Temperaturminima waren die Unterschiede deutlich kleiner. Am 26.06.2021 wurde von der Wetterstation die niedrigste Temperatur mit 11 °C aufgezeichnet, demgegenüber wurde von den Hygrobuttons in der ökologisch bewirtschafteten Parzelle eine Temperatur von 11,9 °C gemessen. Solche minimalen Unterschiede können den Infektionsdruck jedoch schon deutlich erhöhen, nämlich dann, wenn zusätzlich zur warmen Nachttemperatur, ein feuchtes Mikroklima in der Laubwand vorliegt. Ein solches kann nur durch präzise Vorhersagemodelle oder entsprechende Sensoren in der Laubwand erfasst werden. Die Temperaturunterschiede zwischen Versuchsparzelle und Wetterstation könnten durch die verschiedenen Messhöhen (Hygrobuttons sind direkt in der Laubwand montiert, während die Temperatur der Wetterstation (steht auf Freifläche) auf 2 m Höhe gemessen wird) sowie einen Luftstau, der zwischen den Rebzeilen bei geringer Windgeschwindigkeit entsteht, erklärt werden. Die Wetterstation steht in großem Abstand zu den benachbarten Rebzeilen. Es wurden präzise Wetterdaten in den im Rahmen des Vorhabens untersuchten Parzellen aufgenommen. Die Vorjahre haben gezeigt, dass sich die Wetterdaten von den Aufzeichnungen der Wetterstation unterscheiden, deshalb werden die Wetterdaten in die Auswertung und insbesondere Bewertung der erfassten Epidemiologie und sensorbasierter Beschreibung des Infektionsgeschehens in den Freilandparzellen miteinbezogen.

Auch bei der Aufzeichnung von Regenereignissen zeigen sich Unterschiede bei der erfassten relativen Luftfeuchtigkeit. In den Vorjahren war zu beobachten, dass vor allem die Parzelle 24 (ökologisch bewirtschaftete Versuchsparzelle) große Abweichungen im Vergleich zu den von der Wetterstation aufgezeichneten Daten zeigte. Tabelle 3 zeigt, dass die relative

Luftfeuchtigkeit nach einem Regenereignis auch im zurückliegenden Berichtszeitraum teilweise stark von den Aufzeichnungen der Wetterstation abweicht. Die Luftfeuchtigkeit in der Laubwand zeigt sich erneut über einen längeren Zeitraum nach dem Regenereignis als konstant hoch, was auf eine längere Blattnässe insbesondere am Morgen innerhalb der Laubwand hindeutet. Es ist somit davon auszugehen, dass der Infektionsdruck aufgrund längerer Zeiten von Blattnässe höher ist als die Daten der Wetterstation vermuten lassen.

Tab. 3: Relative Luftfeuchtigkeit nach einem Regenereignis in der Nacht des 22.06.2021 an verschiedenen Standorten auf der Liegenschaft des JKI Geilweilerhof. Werte für die relative Luftfeuchtigkeit über 100 % kommen durch technisch bedingte Messfehler zustande (Messgenauigkeit der Hygrobuttons beträgt +/- 5 %).

| Datum/ Uhrzeit | Wetterstation Geilweilerhof | Parzelle 24 (ökol. Bewirtschaftet) |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 22.06.2021 / 04.00 | 96,7% | 102 % |
| 22.06.2021 / 05.00 | 95,2 % | 101,5 % |
| 22.06.2021 / 6.00 | 92,5 % | 102 % |
| 22.06.2021 / 7.00 | 90,0 % | 100,2 % |
| 22.06.2021 / 8.00 | 90,0 % | 95,0 % |
| 22.06.2021 / 9.00 | 89,9 % | 80,0 % |

Die mittels Datenlogger aufgezeichneten Temperatur- und Feuchtigkeitsdaten in den Jahren 2019, 2020 und 2021 zeigten beim Vergleich mit der Wetterstation am Geilweilerhof, in allen Aufzeichnungszeiträumen Unterschiede. Vor allem die Dauer der Blattnässe wird bei Einschätzungen eines Infektionsrisikos mit Falschem Mehltau, die nur auf der gemessenen relativen Luftfeuchtigkeit beruht, häufig unterschätzt. Die Feuchtigkeit, die mittels Datenlogger, innerhalb der Laubwand gemessen werden konnte zeigten, dass die Feuchtigkeitswerte sowohl höher sind als auch über einen längeren Zeitraum auf einem hohen Niveau verharren, während die rel. Luftfeuchtigkeit außerhalb der Laubwand schon wieder niedriger ist. Auch die Temperaturverläufe, die mittels Datenlogger aufgezeichnet wurden, haben gezeigt, dass die Werte im Tagesverlauf, teilweise deutlich von den Werten abweichen, die die Wetterstation aufzeichnet. Vor allem für die Temperaturen zeigte sich der erhebliche Einfluss der Lage der Parzelle und der individuellen Gegebenheiten, wie zum Beispiel Waldrand- oder Senken-Strukturen. Vor allem in der ökologisch bewirtschafteten Versuchsparzelle, konnten konstant in allen drei Versuchsjahren die höchsten Temperaturen innerhalb der Laubwand gemessen werden. Die gemessenen Temperaturen lagen teilweise 3-4 °C über den von der Wetterstation aufgezeichneten Temperaturen.

Die Ergebnisse, die innerhalb des Vorhabens erzielt wurden, verdeutlichen, dass für eine möglichst genaue Prognose eines Infektionsrisikos mit *P. viticola* und damit auch das Ermöglichen einer zielgenauen Pflanzenschutzstrategie, die Erfassung des Mikroklimas in der Laubwand unerlässlich ist. Die bestehenden Prognosemodelle leisten einen sehr wichtigen und entscheidenden Beitrag, um den Infektionsdruck für die jeweilige Region einordnen zu können, lassen aber lokale Unterschiede zwischen verschiedenen Parzellen,

Managementmaßnahmen und Pflanzenarchitektur (z.B. Laubwanddichte) außer Acht. Die beiden Hauptfaktoren Blattnässe und Temperatur müssen für präzise Einschätzungen des Infektionsdrucks in Früherkennungssysteme integriert werden. Die im Rahmen des Vorhabens verwendeten Datenlogger sind hierfür sehr gut geeignet und können auf Grund ihrer flexibel einstellbaren Aufnahmeintervalle auch in der weiteren Forschungspraxis an neue Fragestellungen angepasst werden. Die erhobenen Daten dienen dem Projektpartner 2 (JKI-OW) zur Beschreibung der Infektionsbedingungen in den gemeinsam untersuchten Versuchsflächen zur Untersuchung der möglichen Kupferreduktion. Des Weiteren können die Daten mit den Spektraldaten aus dem Freiland kombiniert werden und die Präzision einer zur Detektion des Falschen Mehltaus möglicherweise verbessern.

5. Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen der Sensordatenerfassung wurde festgestellt, dass die grundlegende Untersuchung von Infektionsreaktionen anfälliger und resistenter Pflanzen ausschließlich an Blattscheiben erfolgen sollte und bei Holzstecklingen eine sehr hohe Anzahl an Pflanzen notwendig ist, um die hohe Fehlerrate verursacht durch sehr heterogene Aufnahmebedingungen (Geometrie der Blätter, Unebenheiten und dadurch unterschiedliche Reflexion des Lichts) auszugleichen. Im abgeschlossenen Projekt AuDiSens wurde eine Zeilenkamera zur Aufnahme von Hyperspektralbildern eingesetzt, welche zwar hochauflösend ist, aufgrund der Bewegung der Kamera (oder alternativ des Objekts) jedoch ca. 4 Minuten pro Bild benötigt. Bei der Aufnahme von Holzstecklingen kann somit ein Datenpunkt pro Bild (= ein Holzsteckling = ein Replikat) gewonnen werden. Bei der Aufnahme von Blattscheibentests werden in einem Bild 2x 96 Datenpunkte erfasst, wodurch die Anzahl an Replikaten deutlich erhöht und die Grundlage für die Entwicklung einer validen KI-basierten Prognose gegeben ist. Um zukünftig mehr Daten für die Übertragbarkeit des von Partner 3 (TU-DA) entwickelten Verfahren XIL (explanatory interactive learning, deu: Erklärbares Interaktives Lernen) von Blattscheiben auf ganze Pflanzen aus dem Gewächshaus und anschließend Freilandpflanzen übertragen zu können, muss daher eine der neusten Hyperspektraltechniken eingesetzt werden, z.B. hochauflösende One-Shot-Kameras, die wie Spiegelreflexkameras nicht bewegt werden müssen und deren Sensortechnik weniger anfällig für Störungen ist. Diese können mittlerweile auch im Feld eingesetzt und mit einer Feldphänotypisierungsplattform für eine automatisierte Bildaufnahme gekoppelt werden und ermöglichen eine Hochdurchsatz-Datenaufnahme.

Im Rahmen des Projektes wurde das Verfahren zur HPLC-basierten Detektion und Quantifizierung von Stilbenen optimiert und die Zeit für die Analyse einer Probe von über 25 Minuten auf 6 Minuten verkürzt.

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Hochdurchsatzaufnahme räumlich und zeitlich hochaufgelöster Sensordaten mit entsprechend präzisen Referenzdaten ist der Schlüssel für die Entwicklung einer validen KI. Um diese ins Freiland übertragen zu können, müssen jedoch erst zuverlässige, reproduzierbare Daten unter standardisierten Bedingungen vorliegen. Im abgeschlossenen Projekt AuDiSens wurden genau solche umfangreichen, vollständigen Datensätze erfasst, welche die Grundlage für eine frühzeitige Detektion von Infektionen mit *Plasmopara viticola* darstellen. Dieser Datensatz ist im Anschluss an das Projekt verfügbar, um spektrale Indikatoren zu identifizieren, welche möglicherweise geeignet sind, um eine Infektion vorherzusagen. Da Genotypen und Rebsorten mit verschiedenen Kombinationen von Resistenzloci (*Rpv3* und/oder *Rpv10* oder keine Resistenz) in diesem Datensatz enthalten sind, können Analysen fortgeführt werden, um zu überprüfen, ob sich Genotypen mit einer einzelnen oder kombinierten Resistenz spektral unterscheiden lassen und auf diese Weise Aufschlüsse über Resistenzmechanismen geben. Hierzu gehört auch eine zerstörungsfreie, sensorgestützte Detektion von Stilbenen bzw. Abwehrreaktionen zur verbesserten Charakterisierung von Zuchtmaterial. Auch wenn die hierfür notwendigen Referenzdaten der chemischen Analyse (HPLC) im Rahmen des Vorhabens nicht mehr zur Verfügung gestellt werden, liegen sie nach Abschluss des Projekts vor und können nun - zum Beispiel im Rahmen einer Abschlussarbeit - mit den aufgenommenen Hyperspektraldaten verrechnet werden. Die Erkenntnisse der Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren in der Laubwand zeigen, dass die Erfassung des Mikroklimas ein wichtiger Baustein bei der bedarfsgerechten Ausbringung von PSM darstellen.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Unerwartet gegenüber dem Projektplan stellte sich die standardisierte Versuchsdurchführung als Herausforderung heraus. Aufgrund der hohen Temperaturen im Frühjahr 2019 war eine zuverlässige Infektion in den „alten“ Gewächshäusern des Instituts schwierig, da sichergestellt werden musste, dass die verwendeten Pflanzen vital sind. Da das Projekt auf eine Frühdiagnose zielt, d.h. die Detektion eines Befalls bzw. einer Abwehrreaktion als Indikatoren für eine Infektion mit *Plasmopara viticola*, müssen Zeitreihen aufgenommen werden. Somit beginnt die Datenaufnahme bereits an t0 (Zeitpunkt direkt vor der Inokulation) und wird dann täglich wiederholt. Ob ein Infektionsversuch zuverlässig funktioniert hat, wird jedoch erst vier bis fünf Tage nach der Inokulation sichtbar. Vor allem im ersten Projektjahr musste zunächst das Protokoll der Infektionsversuche optimiert werden, die Sporenkonzentration im Inokulum erhöht und die Pflanzen in eine optimal steuerbare Klimakabine von Partner 2 (JKI-OW)

angezogen und infiziert werden. Erst im zweiten Projektjahr waren die Bedingungen soweit optimiert, dass Datensätze an Holzstecklingen erfasst werden konnten, die im dritten Projektjahr durch die Aufnahme von Blattscheiben quantitativ und qualitativ optimiert wurden. Dieser Aufwand wurde bei der Projektplanung unterschätzt. Neben der Detektion von Symptomen anfälliger Genotypen (siehe Schlussbericht Partner 3, TU-DA) sollte auch die hyperspektrale Detektion der Stilbensynthese in resistenten Genotypen validiert werden. Die Grundlage hierfür bildet jedoch der analytische Nachweis der Stilbene in inokulierten Blättern bzw. Blattscheiben. Das HPLC System wurde zu Beginn des Projekts mit einem neuen Detektor (MS/MS) ausgestattet, welcher besser für die Stilbendetektion geeignet ist. Dadurch war zunächst eine Anpassung des bestehenden Protokolls notwendig sowie eine deutliche Reduktion der Laufzeit pro Probe (25 Minuten). Aufgrund von Krankheit, Vorschriften der Arbeitssicherheit für Schwangere (Corona-Schutzmaßnahme) und Elternzeit der am JKI-ZR verantwortlichen Mitarbeiterin oblag die Protokolloptimierung Etablierungsarbeit für den sehr komplexen HPLC Nachweis der Stilbene alleinig bei den Projektmitarbeitern, die keine Erfahrung mit der Analyse mitbrachten und von Februar bis August mit Infektionsversuchen beschäftigt waren. Darüber hinaus gab es regelmäßig Systemausfälle durch Ölverlust und Defekt der Vakuumpumpe (essentiell, um den hohen Druck zu erzeugen), die schrittweise jedoch mit Verlust von Zeit und Proben behoben wurden. Erst mit Wiedereintritt der Mitarbeiterin im Herbst 2021 konnte das Protokoll zur Blattextraktion, Analyse und Datenauswertung im Frühjahr 2022 soweit optimiert werden, dass die Analyse der Proben aus dem UV-Versuch ab Mai 2022 beginnen konnte. Zum Projektende waren somit nicht alle Proben, von denen Hyperspektraldaten erfasst wurden, analysiert und standen dem Projektpartner 3 nicht rechtzeitig für die Prognose zur Verfügung. Die Probenanalyse wurde jedoch über das Projektende hinaus fortgeführt, so dass nun ein vollständiger Datensatz bestehend aus Hyperspektralbildern und Referenzdaten (Bonitur- und HPLC-Daten) vorliegt, welcher im Rahmen einer Abschlussarbeit oder im Rahmen eines neuen Projektes als Grundlage nutzbar ist.

Aufgrund der extrem trockenen und heißen Jahre 2019 und 2020 konnten zwar Hyperspektraldatensätze im Freiland erhoben werden, Infektionen mit *P. viticola* wurden jedoch nicht beobachtet. Erst im Jahr 2021 war der natürliche Infektionsdruck für *P. viticola* hoch genug für einen Befall im Freiland und somit auch für die Aufnahme im Freiland geeignet. Bei der ersten Überfahrt fiel jedoch die VNIR-Kamera aus, welche bis zum Projektende nicht mehr einsatzfähig war. Da die Aufnahmesoftware für das Hyperspektralkamerasystem jedoch für das gesamte System konfiguriert ist (Eigenentwicklung im abgeschlossenen Projekt BigGrape), war eine Datenaufnahme mit der SWIR-Kamera nicht möglich. Es waren daher

keine Daten verfügbar, um die Übertragbarkeit des Algorithmus zur frühzeitigen Vorhersage auf Freilanddaten in der Machbarkeitsstudie zu überprüfen.

Neben Publikationen und Tagungsbeiträgen (erfolgt) waren in Arbeitspaket 6 (Wissenstransfer in die Praxis und Wissenschaft) Feldtage für die Praxis geplant. Corona-bedingt waren Feldtage jedoch erst im Frühjahr 2022 wieder möglich. Um den Wissenstransfer dennoch auszuweiten, wurden die Projektergebnisse in Gastvorlesungen am Weincampus (Neustadt an der Weinstraße) im Modul „Präzisionsweinbau“ der Weinbaustudenten vorgestellt, sowie im Rahmen der Regionalkonferenz im August 2022.

8. Literaturverzeichnis

- Alonso-Villaverde, Virginia; Voinesco, Francine; Viret, Olivier; Spring, Jean-Laurent; Gindro, Katia (2011): The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. In: *Plant physiology and biochemistry* : PPB 49 (3), S. 265–274. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.12.010.
- Bai, Ru; Luo, Yangyang; Wang, Lixin; Li, Jing; Wu, Kerun; Zhao, Guifang; Duan, Dong (2019): A specific allele of MYB14 in grapevine correlates with high stilbene inducibility triggered by Al³⁺ and UV-C radiation. In: *Plant cell reports* 38 (1), S. 37–49. DOI: 10.1007/s00299-018-2347-9.
- Bendel, Nele; Backhaus, Andreas; Kicherer, Anna; Köckerling, Janine; Maixner, Michael; Jarausch, Barbara et al. (2020a): Detection of Two Different Grapevine Yellows in *Vitis vinifera* Using Hyperspectral Imaging. In: *Remote Sensing* 12 (24), S. 4151. DOI: 10.3390/rs12244151.
- Bendel, Nele; Kicherer, Anna; Backhaus, Andreas; Klück, Hans-Christian; Seiffert, Udo; Fischer, Michael et al. (2020b): Evaluating the suitability of hyper- and multispectral imaging to detect foliar symptoms of the grapevine trunk disease Esca in vineyards. In: *Plant methods* 16, S. 142. DOI: 10.1186/s13007-020-00685-3.
- Blackburn, George Alan (2007): Hyperspectral remote sensing of plant pigments. In: *J Exp Bot* 58 (4), S. 855–867. DOI: 10.1093/jxb/erl123.
- Bleyer, Gottfried; Kassemeyer, Hanns-Heinz; Krause, Ronald; Viret, Olivier; Siegfried, Werner (2008): „VitiMeteo Plasmopara“ – Prognosemodell zur Bekämpfung von *Plasmopara viticola* (Rebenperonospora) im Weinbau. In: *Gesunde Pflanzen* 60 (3), S. 91–100. DOI: 10.1007/s10343-008-0187-1.
- Carter, Gregory A.; Knapp, Alan K. (2001): Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. In: *Am. J. Bot.* 88 (4), S. 677–684. DOI: 10.2307/2657068.
- Coutos-Thévenot, P.; Poinssot, B.; Bonomelli, A.; Yean, H.; Breda, C.; Buffard, D. et al. (2001): In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. In: *J Exp Bot* 52 (358), S. 901–910. DOI: 10.1093/jexbot/52.358.901.
- Cséfalvay, Ladislav; Di Gaspero, Gabriele; Matouš, Karel; Bellin, Diana; Ruperti, Benedetto; Olejníčková, Julie (2009): Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyll fluorescence imaging. In: *Eur J Plant Pathol* 125 (2), S. 291–302. DOI: 10.1007/s10658-009-9482-7.

- Douillet-Breuil, A. C.; Jeandet, P.; Adrian, M.; Bessis, R. (1999): Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 47 (10), S. 4456–4461. DOI: 10.1021/jf9900478.
- Eisenmann, Birgit; Czermel, Stefan; Ziegler, Tobias; Buchholz, Günther; Kortekamp, Andreas; Trapp, Oliver et al. (2019): Rpv3-1 mediated resistance to grapevine downy mildew is associated with specific host transcriptional responses and the accumulation of stilbenes. In: *BMC plant biology* 19 (1), S. 343. DOI: 10.1186/s12870-019-1935-3.
- Gindro, K.; Spring, J. L.; Pezet, R.; Richter, H.; Viret, O. (2006): Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. 191 Pages / *VITIS - Journal of Grapevine Research*, Vol. 45 No. 4 (2006): *Vitis*. DOI: 10.5073/VITIS.2006.45.191-196.
- Godard, Sophie; Slacanin, Ivan; Viret, Olivier; Gindro, Katia (2009): Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. In: *Plant physiology and biochemistry : PPB* 47 (9), S. 827–837. DOI: 10.1016/j.plaphy.2009.04.003.
- Jeandet, Philippe; Douillet-Breuil, Anne-Céline; Bessis, Roger; Debord, Sylvain; Sbaghi, Mohamed; Adrian, Marielle (2002): Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 50 (10), S. 2731–2741. DOI: 10.1021/jf011429s.
- Kennelly, Megan M.; Gadoury, David M.; Wilcox, Wayne F.; Magarey, Peter A.; Seem, Robert C. (2005): Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. In: *Phytopathology* 95 (12), S. 1445–1452. DOI: 10.1094/PHYTO-95-1445.
- Oerke, Erich-Christian; Herzog, Katja; Toepfer, Reinhard (2016): Hyperspectral phenotyping of the reaction of grapevine genotypes to *Plasmopara viticola*. In: *J Exp Bot* 67 (18), S. 5529–5543. DOI: 10.1093/jxb/erw318.
- Olivier, Viret; Spring, Jean-Laurent; Gindro, Katia (2018): Stilbenes: biomarkers of grapevine resistance to fungal diseases. In: *OENO One* 52 (3), S. 235–241. DOI: 10.20870/oenone.2018.52.3.2033.
- Pezet, Roger; Perret, Camille; Jean-Denis, Julien Bernard; Tabacchi, Raffaele; Gindro, Katia; Viret, Olivier (2003): Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (18), S. 5488–5492. DOI: 10.1021/jf030227o.
- Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Richter, H. (2015): Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. 145 Pages / *VITIS - Journal of Grapevine Research*, Vol. 43 No. 3 (2004): *Vitis*. DOI: 10.5073/VITIS.2004.43.145-148.
- Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Spring, J.-L. (2004b): Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65 (6), S. 297–303. DOI: 10.1016/j.pmpp.2005.03.002.
- Schnee, S.; Viret, O.; Gindro, K. (2008): Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72 (4-6), S. 128–133. DOI: 10.1016/j.pmpp.2008.07.002.

- Stoll, Manfred; Schultz, Hans R.; Berkelmann-Loehnertz, Beate (2008): Exploring the sensitivity of thermal imaging for *Plasmopara viticola* pathogen detection in grapevines under different water status. In: *Functional Plant Biol.* 35 (4), S. 281–288. DOI: 10.1071/FP07204.
- Wang, Chaoxia; Wu, Jiao; Zhang, Yali; Lu, Jiang (2018): *Muscadinia rotundifolia* 'Noble' defense response to *Plasmopara viticola* inoculation by inducing phytohormone-mediated stilbene accumulation. In: *Protoplasma* 255 (1), S. 95–107. DOI: 10.1007/s00709-017-1118-8.
- Wang, Lijun; Ma, Ling; Xi, Huifen; Duan, Wei; Wang, Junfang; Li, Shaohua (2013): Individual and combined effects of CaCl_2 and UV-C on the biosynthesis of resveratrols in grape leaves and berry skins. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (29), S. 7135–7141. DOI: 10.1021/jf401220m.
- Zendler, Daniel; Malagol, Nagarjun; Schwandner, Anna; Töpfer, Reinhard; Hausmann, Ludger; Zyprian, Eva (2021): High-Throughput Phenotyping of Leaf Discs Infected with Grapevine Downy Mildew Using Shallow Convolutional Neural Networks. In: *Agronomy* 11 (9), S. 1768. DOI: 10.3390/agronomy11091768.

9. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

- 1) Kupfertagung 2020 (online): Vortrag "Entwicklung automatisierter Verfahren zur frühzeitigen Felddiagnostik"
- 2) 13th Symposium on Grapevine Breeding and Genetics 2022, Landau: Posterbeitrag „Characterization of grapevine resistance to downy mildew using hyperspectral imaging in SWIR spectral range“

3 Anhang zum Schlussbericht: kurz gefasster Erfolgskontrollbericht

1.1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen (unter Angabe des Schwerpunktes)

AuDiSens ordnet sich in das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) ein. Um gemäß der Nachhaltigkeitsstrategie der Bundesregierung den Anteil ökologisch bewirtschafteter landwirtschaftlicher Flächen zu erhöhen und gleichzeitig den Pflanzenschutzmittelaufwand gemäß des Nationalen Aktionsplans zur nachhaltigen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (NAP - siehe Maßnahme 6.1.1) zu reduzieren, sind gerade im Ökoweinbau neue Strategien erforderlich. In AuDiSens sollte der technische Fortschritt genutzt werden, um durch den Einsatz modernster Sensoren verknüpft mit intelligenten und schnellen Analyseverfahren eine frühzeitige Krankheitserkennung bzw. Risikoabschätzung zu ermöglichen. Im Fokus stand die Entwicklung und Optimierung technischer Lösungen:

- Erarbeitung von innovativen Lösungen zur situationsbezogenen und/oder teilflächenspezifischen Anwendung von Pflanzenschutzmitteln (Precision Farming)
- Entwicklung schneller, sensitiver und spezifischer Diagnoseverfahren für wirtschaftlich bedeutsame Schadorganismen, u.a. auch Felddiagnostik

1.2. Wissenschaftliche und technische Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Sensordatenerfassung: Bei der Auswertung erster Sensordaten durch P3 (TU-DA) wurden enorme Reflexionsunterschiede in einem einzigen Hyperspektralbild innerhalb einer aufgenommenen Pflanze festgestellt, die nicht auf eine unterschiedliche Behandlung zurückzuführen waren. Aus diesen wichtigen Erkenntnissen wurden weitere Aufnahmemodalitäten angepasst und die Versuche daraufhin an Blattscheiben durchgeführt, um möglichst homogene Bedingungen zu schaffen und die Probenanzahl pro Genotyp um ein Vielfaches zu erhöhen. Auf diese Weise wurden pro Bild 2x96 Blattscheiben (1 Blattscheibe = 1 Replikat) anstelle von nur einem Holzsteckling aufgenommen. Durch den Defekt der VNIR-Kamera (400-1.000 nm) wurden Hyperspektralbilder ausschließlich mit der SWIR Kamera erfasst und damit eine wichtige Grundlage geschaffen werden, um nach Anwendung moderner KI- basierter Analyse – Algorithmen, die Detektion von Stilbenen als Indikatoren für einen Befall mit *P. viticola* zu ermöglichen. Damit geht aus dem Vorhaben eine wichtige Datengrundlage hervor, die die Detektion und ggf. auch die Unterscheidung verschiedener Resistenzantworten – in Abhängigkeit von der genetischen Resistenz (Rpv3 oder Rpv10) ermöglichen kann.

Referenzdaten – Visuelle Bonitur des Infektionsgeschehens bzw. der Resistenzreaktionen: Boniturdien dienen der Referenzierung aufgenommener Hyperspektraldaten. Eine valide Referenzierung ist hierbei entscheidend für die korrekte Interpretation der chemischen und spektralen Analysen. Aus diesem Grund erfolgte eine manuelle Bonitur anhand der erhobenen Mikroskopiebilder, sowie die visuelle Klassifikation der Reaktion und quantitative Erfassung der Symptome. Weiterhin konnten im Verlauf des Vorhabens die Bedingungen für die Infektionstests mit *P. viticola* kontinuierlich weiterentwickelt und optimiert werden, was eine bedeutende Grundlage für die präsymptomatische Erkennung einer Infektion mit dem Falschen Mehltau darstellt.

Stilbendetektion und Machbarkeitsstudie der Früherkennung einer Infektion mit *P. viticola*: Zunächst war die Etablierung des Versuchs- und Aufnahmesystems notwendig, welches im Rahmen des Projektes weiterentwickelt und optimiert wurde. Der hierbei aufgewendete Zeitumfang war aufgrund der technisch herausfordernden Aufnahmetechnik

des Hyperspektralsystems wesentlich höher als ursprünglich angenommen. Dabei hat sich gezeigt, dass der Probenumfang eine hyperspektrale Detektion von Stilbenen im Blattgewebe, bzw. ein Infektionsgeschehen bei anfälligen Rebsorten mittels Holzstecklingen aus dem Gewächshaus aufgrund der beschriebenen Varianz der spektralen Reflexionsmuster mit dem analysierten Probenumfang nicht ausreichend hoch war. Das Hyperspektralkamerasystem ist darüber hinaus als Zeilensystem sehr langsam, wodurch eine Steigerung des Probenumfangs nur mit der Umstellung von ganzen Pflanzen auf Blattscheibentests erreicht wurde. Damit wurden Datensätze erzeugt, die zu statistisch fundierten Aussagen führen können. Nachdem die VNIR-Kamera aufgrund eines Defektes seit 2020 nicht mehr einsetzbar war und damit auch die Datenaufnahme im Freiland (funktioniert nur mit beiden Hyperspektralkameras) nicht realisiert werden konnte, wurde der Fokus in enger Kooperation mit dem Projektpartner TU-DA auf die SWIR-Kamera gelegt. Es konnten sechs repräsentative Hyperspektraldatensätze erzeugt werden, deren Auswertung aufgrund fehlender HPLC-Referenzdaten und einem früheren Laufzeitende der TU-DA im Rahmen des Vorhabens nicht mehr realisiert werden konnte. Alle bereits im Vorfeld mit dem Projektpartner TU-DA abgestimmten Maßnahmen und Anpassungen bei der Datenaufnahme führten letztendlich zu einer validen Datenlage zur Entwicklung einer Auswerterroutine, die z.B. im Rahmen einer Abschlussarbeit umgesetzt werden kann. Die im Rahmen des Projekts erhobenen Daten stellen somit einen wichtigen Baustein für die Entwicklung eines Hyperspektraltools zur Erkennung des Falschen Mehltaus dar.

UV-C Induktion Blattscheibentests: Die sensorgestützte, zerstörungsfreie Detektion der Stilbenakkumulation in befallenem Blattgewebe -als essentieller Baustein der Frühdiagnose- wurde analysiert. Hierbei steht und fällt die Leistungsfähigkeit eines Prognosemodells mit der Qualität der Referenzdaten. Parallel zur Etablierung der sensorgestützten Methode, wurde zunächst auch die HPLC-MS/MS zur Stilbendetektion und –Quantifizierung weiterentwickelt, optimiert und etabliert. Hierfür erfolgten zahlreiche Voruntersuchungen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Voruntersuchungen stellte die fehlerhafte Reproduzierbarkeit des HPLC-basierten Stilbennachweises in den Infektionsversuchen mit Falschem Mehltau dar. Um die Ziele des Projektes AuDiSens zu erreichen, erfolgte die Etablierung der Stilben-Detektion an Blattscheiben, die mit UV-C Licht bestrahlt wurden, um die Synthese der Stilbene anzuregen. Die Ähnlichkeit der Stressantwort auf UV-C Strahlung und der Resistenzantwort ist in der Literatur beschrieben. Bei UV-C Licht ($\lambda = 354 \text{ nm}$) handelt es sich um sehr energiereiche elektromagnetische Strahlung, die starke Gewebeschäden auslöst. Im Vergleich zu den lokal sehr begrenzten Resistenzantworten nach Inokulation mit *P. viticola* tritt eine UV-C-induzierte Stilbenproduktion großflächig im gesamten Blattmaterial auf. Beide Systeme (Hyperspektral und HPLC) wurden deshalb zunächst mit dem UV-C-induzierten Blattmaterial kalibriert mit

dem Ziel, Stilbene in geringeren Konzentrationen als Reaktion auf einen Befall mit *P. viticola* zu detektieren. Untersucht wurden Rebsorten mit verschiedenen Resistenzen (*Rpv3* und/oder *Rpv10* oder keine Resistenz). Resistente Rebsorten zeigten eine deutliche Akkumulierung von Stilbenen nach dem UV-C Stressreiz. Auch in anfälligen Sorten wurde z.B. Resveratrol nachgewiesen, die jedoch deutlich unter den Konzentrationen für resistente Rebsorten liegen. Die Resveratrol-Konzentration nimmt tendenziell ab 72 Stunden nach dem Stressreiz wieder ab. Mit der Abnahme der Resveratrol-Konzentration wurde ein stetiger Anstieg der Konzentration sowohl an δ -, als auch an ϵ -Viniferin (den beiden oligomeren Derivaten) in den resistenten Rebsorten beobachtet. Die schnelle Reaktion und damit verbundenen Akkumulierung der Viniferine in Blattscheiben der Rebsorten GF.GA-52-42 und Solaris entspricht den in der Literatur beschriebenen Stressreaktion nach einer Infektion mit *P. viticola*. Ob die detektierten Unterschiede und die Auflösung des eingesetzten Hyperspektralsystems ausreichend hoch ist und somit sensitiv für die Erkennung unterschiedlicher Reflexionsmuster sind, kann abschließend nicht bewertet werden. Die sehr hohen Erkennungsgenauigkeiten der KI-basierten Prognose (siehe Schlussbericht TU-DA) lassen jedoch den Schluss zu, dass die Blattscheiben unterschiedlicher Rebsorten und somit Rebsorten mit unterschiedlichen Resistenzniveau signifikante Unterschiede in ihren Reflexionsmustern im Verlauf der Infektion zeigen und diese zur Frühdiagnose möglicherweise nutzbar sind. Ob diese Reflexionsunterschiede jedoch auf unterschiedliche Stilbenzusammensetzungen und – Konzentrationen in den betroffenen Blattgeweben zurückzuführen ist, muss über das Projektende hinaus anhand der erfassten Daten überprüft werden.

Aufnahme präziser Temperatur- und Feuchtigkeitsdaten: Die bestehenden Prognosemodelle leisten einen sehr wichtigen und entscheidenden Beitrag, um den Infektionsdruck für die jeweilige Region einordnen zu können, lassen aber lokale Unterschiede zwischen verschiedenen Parzellen, Managementmaßnahmen und Pflanzenarchitektur (z.B. Laubwanddichte) außer Acht. Hygrobuttons wurden für die Erfassung der Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen in der Laubwand der untersuchten Parzelle eingesetzt und deren Daten mit denen der nächsten Wetterstation (Geilweilerhof) verglichen. Die Temperatur- und Feuchtigkeitsverläufe in den Laubwänden unterscheiden sich dabei von denen der Wetterstation teils deutlich. Vor allem für die Temperaturen zeigte sich der erhebliche Einfluss der Lage der Parzelle und der individuellen Gegebenheiten, wie zum Beispiel Waldrand- oder Senken-Strukturen. Vor allem in der ökologisch bewirtschafteten Versuchsparzelle, konnten konstant in allen drei Versuchsjahren die höchsten Temperaturen innerhalb der Laubwand gemessen werden. Die gemessenen Temperaturen lagen teilweise 3-4 °C über den von der Wetterstation aufgezeichneten Temperaturen. Solche Unterschiede können auf einen deutlich erhöhten Infektionsdruck hinweisen, nämlich dann, wenn zusätzlich zur warmen Nachttemperatur, ein feuchtes Mikroklima in der Laubwand vorliegt. Die Ergebnisse, die

innerhalb des Vorhabens erzielt wurden, verdeutlichen somit, dass für eine möglichst genaue Prognose eines Infektionsrisikos mit *P. viticola* und damit auch das Ermöglichen einer zielgenauen Pflanzenschutzstrategie, die Erfassung des Mikroklimas in der Laubwand unerlässlich ist und für präzise Einschätzungen des Infektionsdrucks in Früherkennungssysteme integriert werden sollten. Die im Rahmen des Vorhabens verwendeten Datenlogger sind hierfür sehr gut geeignet und können auf Grund ihrer flexibel einstellbaren Aufnahmeintervalle auch in der weiteren Forschungspraxis an neue Fragestellungen angepasst werden.

1.3. Erfindungen und Schutzrechtsanmeldungen

Im Verbundprojekt wurden keine Erfindungen oder Schutzrechtsanmeldungen eingereicht.

1.4. Wirtschaftliche, wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont), u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise genutzt werden könnten. Etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen

Nach Projektende können die Erkenntnisse zur Erfassung des Mikroklimas in der Laubwand genutzt werden, um weinbergsspezifische Vorhersagemodelle für das Auftreten von Schaderregern weiterzuentwickeln und zu evaluieren (5 Jahre). Um die im Labor generierten Erkenntnisse auf Freilandbedingungen zu übertragen, sind - zunächst - schnelle, hochauflösende Hyperspektralsensoren notwendig. Inzwischen sind neue One-Shot-Hyperspektralkameras am Markt verfügbar, zum Beispiel der Firma HAIP. Die Anforderungen an eine solche Sensortechnik können von Kameraherstellern aufgegriffen und berücksichtigt werden (10 Jahre). Von einer Fortführung der Arbeiten auf Basis der in AuDiSens gewonnenen Erkenntnisse wird auch die Weinbaupraxis profitieren, da die Epidemiologie von PIWI-Rebsorten und eines sensorgestützten Monitorings die tatsächlichen Infektionsbedingungen im Weinberg. Die Hochdurchsatzaufnahme räumlich und zeitlich hochaufgelöster Sensordaten mit entsprechend präzisen Referenzdaten ist der Schlüssel für die Entwicklung einer validen KI. Um diese ins Freiland übertragen zu können, müssen jedoch erst zuverlässige, reproduzierbare Daten unter standardisierten Bedingungen vorliegen. Im abgeschlossenen Projekt AuDiSens wurden genau solche umfangreichen, vollständigen Datensätze erfasst, welche die Grundlage für eine frühzeitige Detektion von Infektionen mit *Plasmopara viticola* darstellen. Dieser Datensatz ist im Anschluss an das Projekt verfügbar, um spektrale Indikatoren zu identifizieren, welche möglicherweise geeignet sind, um eine Infektion vorherzusagen (3 Jahre nach Projektende). Da Genotypen und Rebsorten mit verschiedenen Kombinationen von Resistenzloci (*Rpv3* und/oder *Rpv10* oder keine Resistenz) in diesem Datensatz enthalten sind, können Analysen fortgeführt werden, um zu überprüfen, ob sich

Genotypen mit einer einzelnen oder kombinierten Resistenz spektral unterscheiden lassen und auf diese Weise Aufschlüsse über Resistenzmechanismen geben (5 Jahre nach Projektende). Hierzu gehört auch eine zerstörungsfreie, sensorgestützte Detektion von Stilbenen bzw. Abwehrreaktionen zur verbesserten Charakterisierung von Zuchtmaterial. Mittels der etablierten HPLC Methode zur Detektion und Quantifizierung von Stilbenen können andere Fragestellungen zur Resistenzantwort bzw. Stressreaktion untersucht werden (5 Jahre nach Projektende). Die Erkenntnisse der Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren in der Laubwand zeigen, dass die Erfassung des Mikroklimas ein wichtiger Baustein bei der bedarfsgerechten Ausbringung von PSM darstellen.

- 1.5. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse sowie Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Als nächster Schritt steht die Auswertung der erhobenen Datensätze im Vordergrund, um signifikante Reflexionsunterschiede zur frühzeitigen Identifikation einer Infektion oder Abwehrreaktion gegenüber *P. viticola* zu detektieren. Darauf aufbauend kann die Übertragbarkeit des Diagnosetools auf ganze Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus und schließlich auf Freilandpflanzen geprüft werden. Dies kann nur unter Verwendung leistungsstarker, hochauflösender und schneller Hyperspektralkameras erfolgen, um die notwendige Anzahl an Pflanzen pro Vegetationsperiode und Sorte/Genotyp aufnehmen zu können.

- 1.6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.

Die Arbeiten wurden – bis auf die Machbarkeitsstudie anhand von Freilanddaten wegen des Kameradefekt - wie geplant und dargestellt durchgeführt. Der Umfang der Arbeiten und die hierfür verausgabten finanziellen Mittel waren entsprechend der Arbeitspakete notwendig und angemessen.