



↑

Infodienst

Newsletter-Abo

Jahresausgaben (PDF)

2013

2012

2011

Dezember

November

Oktober

September

August

Juli

Juni

Mai

April

Sensorikschulung

Forschung

Obstbau

EinBlick

Pflanzenschutz

Gemüse und Kräuter

Cartoon des Monats

Veranstaltungen

März

Februar

Januar

2010

2009

2008

2007

2006

2005

2004

2003

2002

2001

**Infodienst
Weihenstephan**■ **Infodienst Weihenstephan - Ausgabe April 2011**■ **Forschung**■ **Zerstörungsfreie Bestimmung von Stickstofffraktionen in Zierpflanzenstecklingen mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS) als Basis einer Qualitätsbeurteilung****Hintergrund und Stand des Wissens**

Durch den hohen Technisierungs- und Automatisierungsgrad im Zierpflanzenbau werden immer höhere Anforderungen an die Qualität von Stecklingen gestellt, da qualitativ hochwertige Stecklinge die Grundvoraussetzung für eine gleichmäßige und zügige Pflanzenentwicklung bilden. Solche Stecklinge bewurzeln in möglichst kurzer Zeit, unter Beibehaltung der grünen Blattfarbe und bei geringen Ausfallquoten.

Eine Qualitätsbeurteilung erfolgt derzeit vor allem nach äußerlichen Kriterien wie Krankheits- und Schädlingsfreiheit oder Reifegrad und Ausfärbung. Diese Kriterien lassen allerdings nur eine sehr oberflächliche Qualitätsbeurteilung zu. Zum Teil werden noch Kriterien wie Länge oder Gewicht für eine Sortierung herangezogen, um eine gleichmäßige Bewurzelung zu erreichen. Aussagen über die tatsächliche Bewurzelungsfähigkeit sind damit allerdings nicht möglich.

Für die Bewurzelungsfähigkeit ist der physiologische Status der Stecklinge maßgeblich. Dieser ist durch den Gehalt an Nähr-, Reserve- und weiteren Inhaltsstoffen wie Chlorophyll oder Phytohormone charakterisiert. Wie für das gesamte Pflanzenwachstum spielt der Stickstoffstatus auch hier eine entscheidende Rolle. So zeigte sich z.B. bei Chrysanthenen in verschiedenen Versuchen, dass die Bewurzelung der Stecklinge durch eine unzureichende Stickstoffversorgung der Mutterpflanzen nachhaltig limitiert wird.

Um aber den Stickstoffstatus von Stecklingen als Basis einer Qualitätsbeurteilung nutzen zu können, werden neue Analyseverfahren benötigt, da die etablierten nass-chemischen Verfahren wie Kjeldahl und Dumas hierfür zu zeitintensiv und vor allem zu teuer sind. Eine mögliche Alternative ist die Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS). Daher wurde von der FGW gemeinsam mit dem Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt (IGZ) in Erfurt-Kühnhausen sowie den drei Jungpflanzenbetrieben Endisch, Dümmlen und Kientzler ein Forschungsprojekt¹ zum Einsatz der Nah-Infrarot-Spektroskopie zur zerstörungsfreien Beurteilung des Bewurzelungspotentials von Zierpflanzenstecklingen initiiert. Eine Aufgabe der FGW in diesem Verbundprojekt besteht in der Entwicklung einer Kalibrierung zur Bestimmung des Gesamt-N, einzelner N-Fraktionen (Amid-N, Nitrat-N, Amino-N und Protein-N) bzw. verschiedener Summenparametern (organisch gebundenen N-Fraktionen (ONF-N) = Amino-N + Protein-N und extrahierbare N-Fraktionen (ENF-N) = Amid-N + Nitrat-N + Amino-N).

¹Die Förderung des Verbundprojektes erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.



[Informationen zum Projekt NIRS](#)**NIRS-Kalibrationsentwicklung**

Bei der NIRS handelt es sich um ein indirektes, photometrisches Verfahren, das auf der Anregung von NH-, OH-, CH- und SH-Bindungen durch elektromagnetische Strahlung im Infrarot-Bereich basiert. Die besonderen Vorteile der NIRS sind die Schnelligkeit der Bestimmung (wenige Sekunden) sowie die Möglichkeit eine Vielzahl von Parametern gleichzeitig zu messen. Zudem werden keine Verbrauchsmaterialien wie Chemikalien oder Gase benötigt. Im landwirtschaftlichen Bereich wird die NIRS unter anderem zur Bestimmung des Proteingehaltes unterschiedlicher Produkte (z.B. Getreide, Leguminosen oder Silagen) genutzt, wobei die Proben vor der Analyse allerdings getrocknet und fein vermahlen werden. Um die Schnelligkeit der NIRS optimal zu nutzen und zusätzlich die Stecklinge nicht zu zerstören, wird auf diese Probenvorbereitung allerdings verzichtet. Die Methodik der Kalibrationsentwicklung ist schematisch in Abbildung 1 beschrieben und wird im Folgenden auch nach diesem Schema dargestellt, wobei neben den Ergebnissen auch immer einige fachliche Grundlagen der NIRS näher erläutert werden.

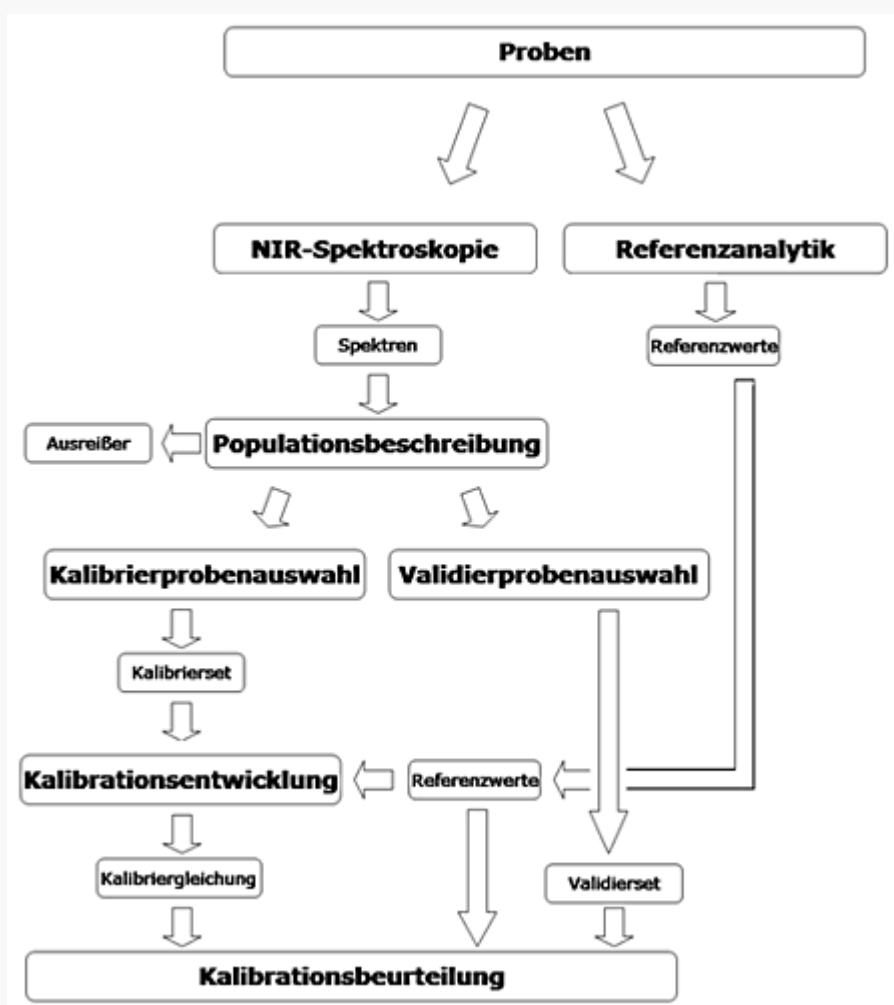


Abb. 1: Methodik der Kalibrationsentwicklung (verändert nach Tillmann 1996)

Proben

In der ersten Projektphase erfolgen die Arbeiten an Chrysanthemem und Pelargonienstecklingen. Die Stecklinge stammen dabei von Mutterpflanzenbeständen (4 Sorten je Kultur) an der FGW, die differenziert (niedrig, normal, hoch) mit Stickstoff versorgt werden sowie aus der laufenden Produktion der drei beteiligten Jungpflanzenbetriebe (20 Sorten je Kultur). Die Stecklingsernten an der FGW bzw. die Lieferungen durch die Betriebe erfolgen zu vier Terminen verteilt über den gesamten Beerntungszeitraum eines Mutterpflanzenbestandes. Die Entwicklung einer gemeinsamen Kalibration für die beiden Gattungen - die in einem späteren Projektabschnitt noch auf drei weitere Gattungen ausgedehnt werden soll - hat vor allem wirtschaftliche Gründe. Je breiter der

Anwendungsbereich der Kalibrierung ist, umso mehr verteilt sich der Aufwand für die Entwicklung und Pflege der Kalibrierung. Die Vielzahl der Sorten und Liefertermine ist die Grundlage für die Entwicklung einer so genannten globalen Kalibrierung mit der auch zukünftige Proben bestimmt werden können. Durch die Stecklinge von den differenziert mit Stickstoff gedüngten Mutterpflanzenbeständen wird zusätzlich eine große Variabilität der Stickstoffgehalte erreicht.

NIRS-Messung und Referenzanalytik

Die NIR-Spektren werden mit einem Zeiss-Corona 1.7 NIR Dioden-Array-Spektrometer (Wellenlängenbereich von 960 bis 1690 nm) mit drehbarem Aufsatz zur Probenpräsentation (Turnstep) aufgenommen. Für die Messungen werden 5 bis 8 Stecklinge (je nach Größe) ringförmig mit der Sprossbasis in eine Petrischale auf dem Turnstep gelegt und durch ein aufgelegtes Glasgefäß möglichst plan an den Boden der Petrischale gedrückt (Abb. 2).



Abb. 2: Auflegen der Stecklinge auf dem Turnstep und Durchführung der Messung

[▲ Nach oben](#)

Jede Stecklingsprobe wurde in fünf Teilproben aufgeteilt, die ohne Umlagerung vierfach wiederholt gemessen werden. Je Stecklingsproben wurden also 20 Absorptionsspektren ($\log 1/R$) die für die Kalibrationsentwicklung später gemittelt wurden, aufgenommen. Nach der Messung wurden die Stecklinge für die Referenzanalytik bei 60°C getrocknet und fein vermahlen. Die Bestimmung der vier N-Fractionen (Amid-N, Nitrat-N, Amino-N und Protein-N) sowie des Gesamt-N erfolgte am IGZ in Erfurt nach einem modifizierten Kjeldahl-Verfahren.

Populationsbeschreibung

Im ersten Schritt der Kalibrationsentwicklung wird die Ähnlichkeit der Spektren untersucht. Dies geschieht mittels einer Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis/PCA). Zum einen dient die PCA dazu Fehlmessungen, verursacht z.B. durch eine falsche Probenpräsentation, zu identifizieren und aus der weiteren Kalibrationsentwicklung auszuschließen. Des Weiteren muss sichergestellt werden, dass zwischen den Spektren verschiedener Proben, in diesem Fall vor allem zwischen den beiden Pflanzengattungen, keine systematischen Unterschiede bestehen, die eine erfolgreiche Kalibrierung unmöglich machen.

Abbildung 3 zeigt die xy-Graphen für die Hauptkomponenten 1 und 2 [A] sowie 2 und 3 [B]. Die Werte für Chrysanthemen sind blau, für Pelargonien grün dargestellt. In Grafik [A] sind systematische Unterschiede zwischen den beiden Pflanzengattungen zu erkennen, die Werte der Chrysanthemen liegen überwiegend oberhalb der x-Achse, die der Pelargonien darunter. Bestehen keine Unterschiede zwischen den Spektren, müsste sich eine kreisförmige, für beide Gattungen gleichmäßige Verteilung um den Koordinatenursprung ergeben. Dieses Bild einer symmetrischen Population ergibt sich bereits ab der 2. und 3. Komponente [B]. Die

Unterschiede zwischen den Spektren der beiden Pflanzengattungen sind insgesamt so gering, dass eine gemeinsame Kalibrierung möglich ist.

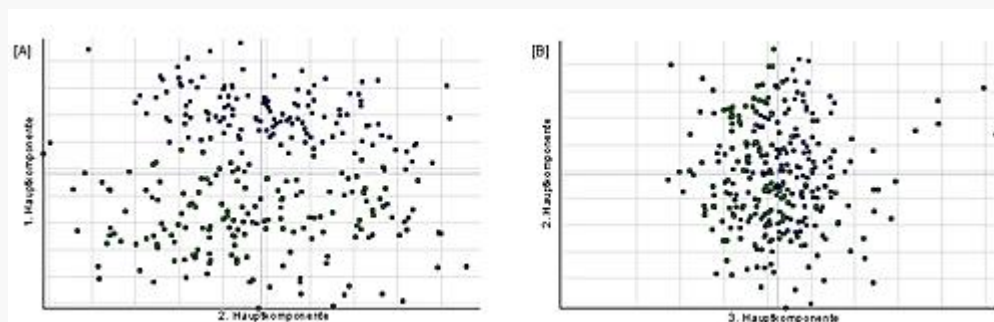


Abb. 3: Grafische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse

Kalibrier- und Validierprobenauswahl

Die Kalibrier- und Validierprobenauswahl ist für die Güte der Kalibrierung von entscheidender Bedeutung. Die Kalibrierproben müssen die gesamte Variabilität der Proben abbilden. Die Validierproben stellen eine davon unabhängige Stichprobe dar, mit der die Güte der Kalibrierung geprüft wird. Für die Kalibrierung standen insgesamt 209 Proben, 93 Chrysanthem- und 116 Pelargonienproben, zur Verfügung. Die Proben wurden getrennt nach Chrysanthem- und Pelargonien aufsteigend nach ihrem Gesamt-N-Gehalt sortiert und jede 5. Probe für das Validierprobenset entnommen. Im Kalibrierprobenset verblieben 168 Proben (75 Chrysanthem- und 93 Pelargonien). Das Validierprobenset umfasste 41 Proben (18 Chrysanthem- und 23 Pelargonien). Die Spannweite der vier einzelnen Stickstofffraktionen, der beiden Summenparameter und des Gesamt-N sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Spannweiten der Stickstoffgehalte im Kalibrier- bzw. Validierprobenset getrennt nach Chrysanthem- und Pelargonien

Wertebereich N-Fractionen [mg N · g TM ⁻¹]	Kalibrierproben		Validierproben	
	Chrysantheme (n = 75)	Pelargonie (n = 93)	Chrysantheme (n = 18)	Pelargonie (n = 23)
Amid-N	0,2 - 2,6	0,2 - 3,6	0,2 - 1,7	1,1 - 4,2
Nitrat-N	0,5 - 8,0	0,0 - 2,1	0,5 - 5,9	0,1 - 1,8
Amino-N	3,0 - 16	1,8 - 10	2,2 - 15	2,9 - 9,9
Protein-N	18 - 38	12 - 34	22 - 36	14 - 32
Gesamt-N	23 - 54	15 - 46	27 - 50	19 - 42
ENF-N	3,7 - 20	2,6 - 14	3,3 - 18	5,0 - 14
ONF-N	22 - 50	15 - 41	26 - 47	17 - 39

[▲ Nach oben](#)

Kalibrationsentwicklung

Da die Spektren in (diffuser) Reflexion gemessen werden sind sie in der Regel von Streu- oder Störlichteffekten überlagert, solche Effekte äußern sich beispielsweise durch eine Parallelverschiebung der Spektren oder einen Anstieg der Basislinie. Durch verschiedene Verfahren der Datentransformation z.B. die Standardisierung der Spektren (Standard Normal Variate (SNV) Transformation) oder das Eliminieren linearer Trends (Detrend) sowie die Nutzung der ersten oder zweiten Ableitung anstelle der Original-Spektren können solche Störungen beseitigt werden. Abbildung 4 zeigt die Effekte unterschiedlicher Schritte der Datenvorbehandlungen: [A] Originalspektren (log 1/R), [B] Originalspektren nach Datentransformation (SNV+Detrend) und [C] 1. Ableitung (1,6,6) der Spektren nach Datentransformation (SNV+Detrend).

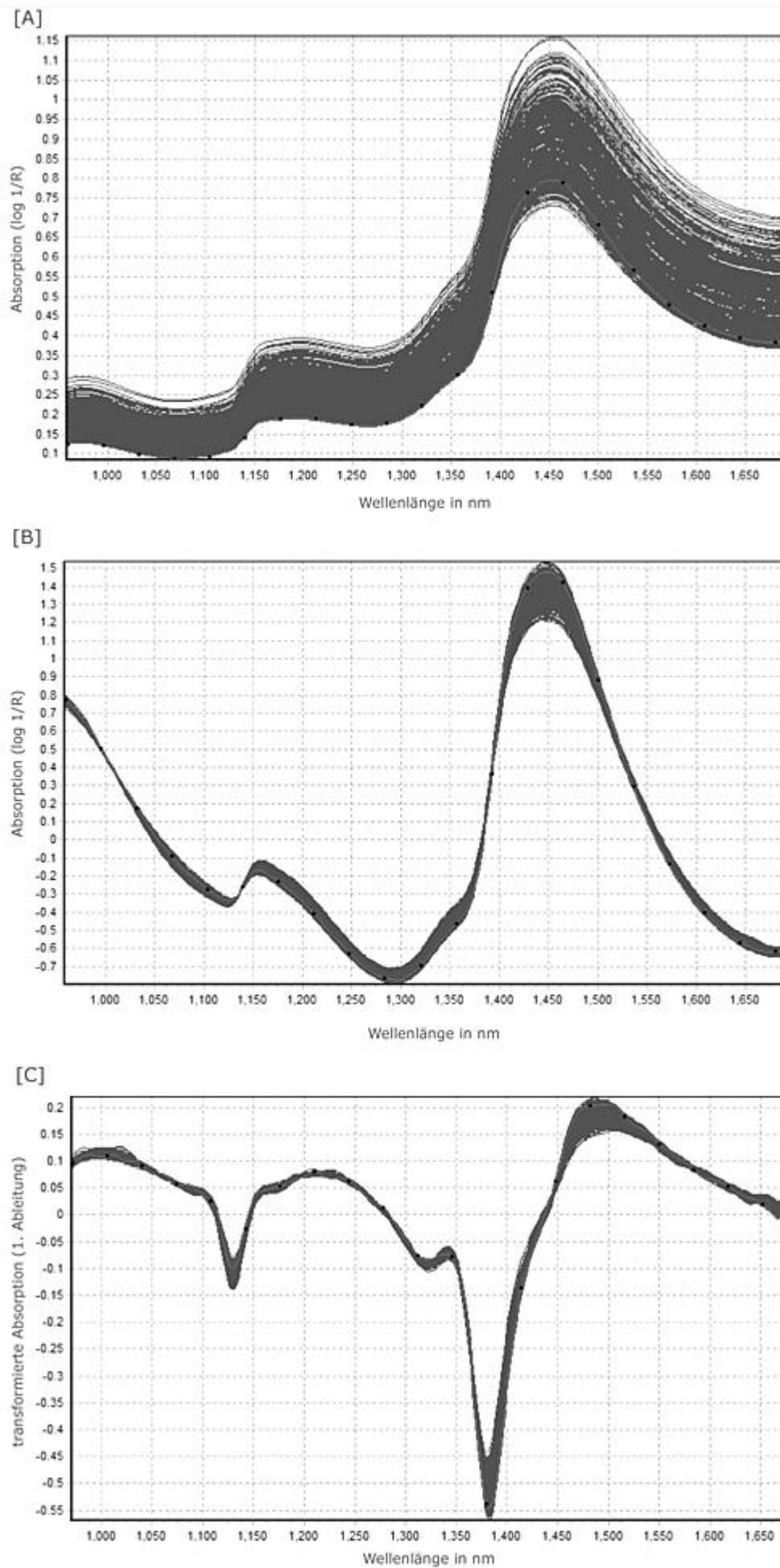


Abb. 4: Effekt der Datenvorbehandlung: [A] Original-Spektren, [B] Datentransformation SNV + Detrend und [C] Datentransformation SNV + Detrend und Bildung der 1. Ableitung (1,6,6)

Im Rahmen der Kalibrationsentwicklung wurden verschiedene Verfahren der Datentransformation (ohne, SNV, Detrend und SNV+Detrend) jeweils in Kombination mit den Originalspektren ($\log 1/R$) sowie deren erster und zweiten Ableitung (Schrittweiten und Glättung der Ableitung jeweils 6 bzw. 12) geprüft. Die Kalibriergleichung wurde nach dem PLS-Verfahren (Partial Least Square Regression) erstellt, wobei die Zahl der Faktoren im Modell schrittweise erhöht wird. Durch die zunehmende Anzahl Faktoren steigt die Güte der Vorhersage, ausgedrückt durch den Standardfehler der Kalibrierung (SEC) und das Bestimmtheitsmaß RC^2 , kontinuierlich an. Um eine Überanpassung des Modells durch die Aufnahme zu vieler Faktoren zu vermeiden, wurde eine Kreuzvalidierung durchgeführt. Dabei wird umlaufend ein Teil der Kalibrierproben mit einer Kalibriergleichung basierend auf den restlichen Proben geschätzt und die mittlere Abweichung zum Referenzwert (SECV = Standardfehler der Kreuzvalidierung) ermittelt. Zu Beginn der Rechnung (mit nur wenigen Faktoren im Modell) wird der SECV mit jedem weiteren Faktor, der aufgenommen wird, kleiner. Ab dem Moment der Überanpassung allerdings steigt der SECV bei jedem weiteren Faktor wieder an. Die Anzahl der notwendigen Faktoren hängt dabei wesentlich vom zu bestimmenden Merkmal und der Homogenität der Proben ab.

Eine Streulichtkorrektur nach dem Verfahren SNV + Detrend in Kombination mit den $\log 1/R$ -Spektren (Math. Treatment 0,0,0) lieferte für alle Parameter die besten Ergebnisse. Zwar konnte durch die Verwendung der ersten Ableitung mit Schrittweite und Glättung 12 (Math. Treatment 1,12,12) die Anzahl Faktoren zum Teil deutlich reduziert werden, gleichzeitig nahmen aber der SEC und der SECV zu. So sank z.B. für den Protein-N die Anzahl der verwendeten Faktoren von 17 auf 13, im Gegenzug stieg der SEC von 1,73 mg N · g TM⁻¹ auf 2,54 und der SECV von 2,40 mg N · g TM⁻¹ auf 2,91 mg N · g TM⁻¹. Die Zahl der Faktoren, die in den Kalibrierungen für die verschiedenen N-Fractionen verwendet werden, sowie die Güteparameter der Kalibrierung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Güteparameter der Kalibrierung

N-Fraktion [mg N · g TM ⁻¹]	Modell	Anzahl Faktoren	RC^2	SEC	RCV^2	SECV
Amid-N	SNV/Detrend 0,0 β	18	0,75	0,39	0,64	0,45
Nitrat-N		18	0,84	0,62	0,64	0,92
Amino-N		16	0,76	1,34	0,62	1,60
Protein-N		17	0,92	1,67	0,87	2,13
Gesamt-N		15	0,92	2,51	0,86	3,21
ENF-N		21	0,78	1,74	0,66	2,10
ONF-N		15	0,92	2,24	0,86	2,80

Kalibrationsbeurteilung

Eine erste, einfache Beurteilung ist an Hand der statistischen Kenngrößen der Kalibrierung (SEC, RC^2 bzw. SECV und RCV^2) möglich. Diese sind für den Protein-N, den ONF-N, den Gesamt-N und mit Einschränkungen für den Nitrat-N zufriedenstellend. Die Anzahl Faktoren ist für alle Parameter recht hoch, was jedoch vor allem durch die Messungen an frischen, ganzen Stecklingen erklärbar ist, da sowohl die Struktur (Oberflächenbeschaffenheit, Form, Größe) der Proben als auch der Wassergehalt die Spektren stark beeinflussen.

Die endgültige Güte der Kalibrierung kann aber nur an Hand der unabhängigen Validierproben erfolgen. Als Güteparameter dienen der systematische Fehler (BIAS) ausgedrückt als Unterschied zwischen dem Mittelwert der Labor-/Referenzwerte sowie der mittels NIRS ermittelten Werte, dem um den systematischen Fehler korrigierten Standardfehler der Vorhersage SEP(C), dem Bestimmtheitsmaß der Validierung RV^2 und der Regressionsgleichung der Validierung.

Ein systematischer Fehler ist bei keinem Parameter zu erkennen. Die beste Kalibrierung wird für den Protein-N mit einem RV^2 von 0,90 und einem $SEP(C)$ von $1,87 \text{ mg N} \cdot \text{g TM}^{-1}$ erreicht. Auch die organisch gebundenen N-Fractionen (ONF-N) lassen sich gut quantifizieren ($RV^2 = 0,84$, $SEP(C) = 3,0 \text{ mg N} \cdot \text{g TM}^{-1}$). Gleiches gilt für den Gesamt-N mit einem RV^2 von 0,78 und einem $SEP(C)$ von $3,8 \text{ mg N} \cdot \text{g TM}^{-1}$. Die Steigung der Regressionsgeraden für diese Parameter ist mit 0,92 bis 0,96 sehr nahe bei 1 und der y-Achsenabschnitt ist relativ klein.

Zusätzlich zum Protein-N, bzw. den von diesem dominierten Summenparameter ergibt sich auch für den Nitrat-N noch eine akzeptable Kalibrierung ($RV^2 = 0,75$, $SEP(C) = 0,79 \text{ mg N} \cdot \text{g TM}^{-1}$). Für Amid- und Amino-N sowie die Summe der extrahierbaren N-Fractionen (ENF-N) ist die erreichte Genauigkeit ungenügend. Die Güteparameter der Validierung sowie die Regressionsgeraden sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Abbildungen 3 A-D zeigen die xy-Graphen für die Validiergleichungen für Protein-N, ONF-N, Gesamt-N und Nitrat-N.

Tabelle 3: Güteparameter der Validierung

N-Fraktion [mg N · g TM ⁻¹]	Mittelwert		R_v^2	SEP(C)	Regressions- gleichung
	NIRS	Referenzanalytik			
Amid-N	1,55	1,58	0,65	0,52	$0,91 \cdot x + 0,11$
Nitrat-N	1,93	1,86	0,75	0,78	$0,88 \cdot x + 0,29$
Amino-N	7,97	7,75	0,55	1,69	$0,76 \cdot x + 2,11$
Protein-N	25,9	25,9	0,90	1,85	$0,97 \cdot x + 0,76$
Gesamt-N	36,9	37,1	0,78	3,72	$0,92 \cdot x + 2,91$
ENF-N	11,5	11,2	0,64	2,12	$0,74 \cdot x + 3,27$
ONF-N	33,6	33,6	0,83	2,69	$0,96 \cdot x + 1,23$

▲ Nach oben

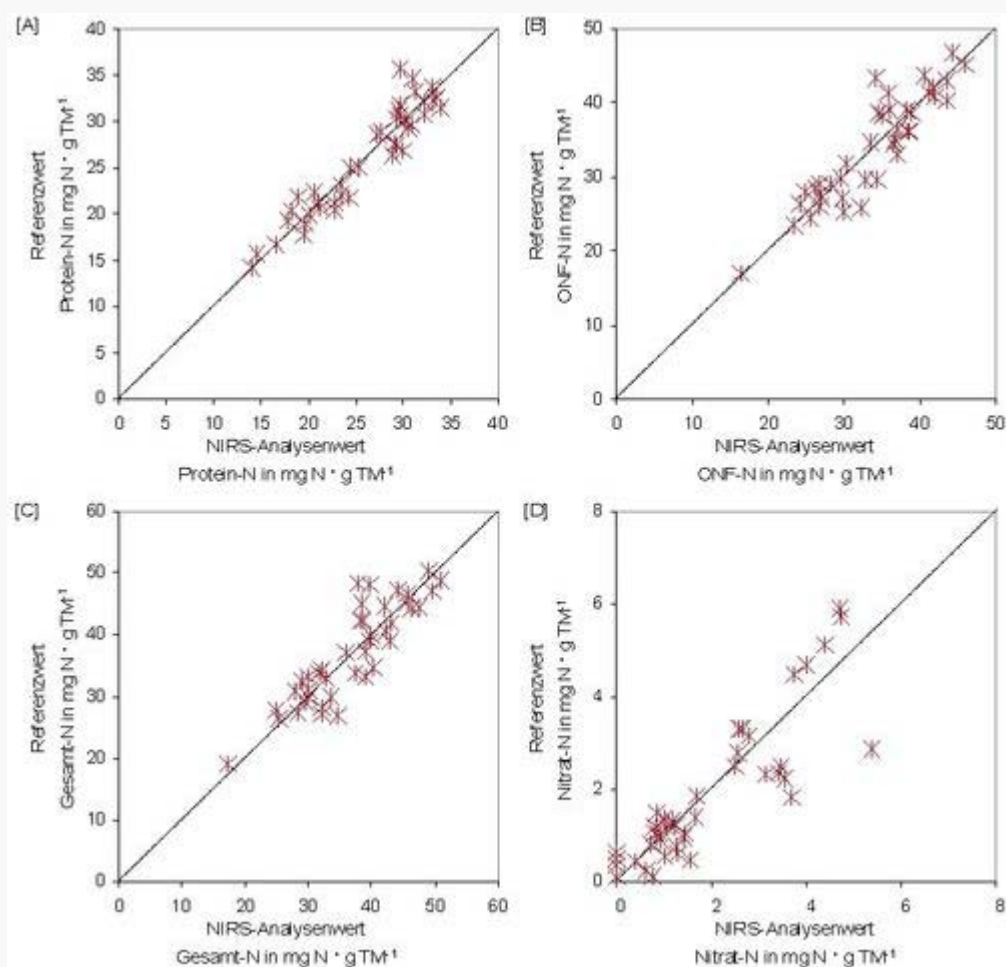


Abb. 5: xy-Graphen der Validierung für Protein-N [A], ONF-N [B], Gesamt-N [C] und Nitrat-N [D]; die gestrichelte Linie markiert die erste Winkelhalbierende

Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Bestimmung des Gesamt-N sowie einzelner N-Fractionen an frischen Zierpflanzenstecklingen mittels NIRS möglich ist und dass eine gemeinsame Kalibrierung für verschiedene Pflanzengattungen genutzt werden kann.

Die für den Gesamt-N erreichte Genauigkeit ist vergleichbar mit Ergebnissen aus einer vorangegangenen Untersuchung mit Chrysanthemen- und Poinsettienstecklingen. Die in dieser Arbeit geäußerte Vermutung, dass durch eine fraktionierte Stickstoffbestimmung die Genauigkeit gesteigert werden kann, wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

Die Absorption im nahen Infrarot wird im Wesentlichen durch Ober- und Kombinationsschwingungen von OH-, NH-, CH- und SH-Bindungen verursacht, was die gute Bestimmbarkeit des Protein-N erklärt. Auf Grund des hohen Protein-N-Anteils von 77 % an den organisch gebundenen N-Fractionen sowie 70 % vom Gesamt-N, lassen sich auch diese zufriedenstellend bestimmen. Die akzeptablen Ergebnisse bei der Bestimmung des Nitrat-N dürften vor allem auf eine enge Korrelation ($r = 0,69$) zwischen Protein- und Nitrat-N zurückzuführen sein, da das Nitrat-Molekül im Bereich des nahen Infrarot keine - oder zumindest nur sehr schwer detektierbare - Absorptionsbanden besitzt.

Beim Amid-N und Amino-N sowie der Summe der extrahierbaren N-Fractionen, von denen der Amino-N im Mittel 70 % ausmacht, ist das geringe Niveau dieser Inhaltsstoffe zu berücksichtigen. Die sehr heterogene Probenmatrix (frische, ganze Stecklinge unterschiedlicher Arten bzw. Gattungen) erschwert die Bestimmung von Bestandteilen mit geringen Gehalten und erklärt gleichzeitig die vergleichsweise hohe Anzahl Faktoren in der Kalibrierung.

Im weiteren Verlauf des Forschungsprojektes ist neben einer Weiterentwicklung der Kalibration durch die Hinzunahme weiterer Proben sowie deren Ausweitung auf andere Kulturen zu klären, welche Bedeutung die einzelnen N-Fractionen für das Bewurzelungspotential der Stecklinge haben und ob diese mittels NIRS mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden können, um darauf aufbauend eine Prognose des Bewurzelungspotentials abzugeben. Zudem ist eine Nutzung der NIRS zur Bestimmung von Kohlenhydratgehalten der Stecklinge geplant.

Hinweis

Die Inhalte dieses Beitrages wurden im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft in Form eines Posters und einer Kurzveröffentlichung publiziert.

Dipl. Ing. (FH) Dieter Lohr
Institut für Gartenbau