

Phép đo phát xạ photon sinh học ở thực vật – Một phương pháp khác dùng để giám sát tác nhân gây stress

Measurement of Biophoton Emission in Plants – An Alternative Monitoring System for Stress Factors

Manfred Hennecke^{€*}; Angela Brück^{€*}

- Phát huỳnh quang chậm và tạo ảnh photon sinh học là hai công cụ không can thiệp dùng trong giám sát tác nhân gây stress
- *delayed fluorescence and biophoton imaging are non invasive tools to monitor stress*

Tóm tắt

Abstract

Phát xạ photon sinh học (BE) hay tạo ảnh tự phát quang dùng để đo trạng thái stress của cây mà không gây can thiệp tương tự như phương pháp phát huỳnh quang chậm. Cả hai phương pháp đều sử dụng ánh sáng phát xạ rất yếu với mục đích giám sát trạng thái vật lý của cây. Ở nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ra sự khác nhau giữa cả hai phương pháp và các thông số được sử dụng trong các phép đo thực hiện bởi hệ tạo ảnh thực vật NightSHADE.

Biophoton emission (BE) or autoluminescence imaging is a method to measure stress status of plants in a non-invasive way similar to delayed fluorescence. Both are extremely weak light emissions which can be used to monitor the physical state of a plant. Here we show the difference between both methods and state parameters to perform these measurements using the NightSHADE plant imaging system.

[€] Communicated by BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Calmbacher Str. 22, D-75323 Bad Wildbad, Germany

* Address all correspondence to: angela.brueck@berthold.com

Giới thiệu

Introduction

Phát huỳnh quang yếu (DF) là ánh sáng phát xạ với cường độ thấp được tạo ra bởi những cây tươi tốt đã được chiếu sáng từ trước (tham khảo tài liệu¹). Một ví dụ về ảnh hưởng của nhiễm nấm và hạn hán lên quá trình phát huỳnh quang chậm đã được chúng tôi công bố ở ghi chú ứng dụng AN985_003². Cường độ phát huỳnh quang chậm dựa trên lượng diệp lục còn nguyên vẹn và giảm trong trường hợp cây bị stress. Trái lại, chúng tôi vẫn chưa xác định được nguồn phát xạ photon sinh học và cường độ phát xạ photon sinh học có xu hướng tăng ở những bộ phận cây chịu tác nhân stress.

Cường độ phát xạ photon sinh học cực yếu được tạo ra nhằm đáp ứng các tác nhân stress như vết bầm trên cây, độ muối, hay do mầm bệnh tấn công. Cường độ này thường vào khoảng dưới 1000 photons/s*cm^{3,4} và tương quan với sự phóng thích gốc tự do oxy hóa (ROS) từ tế bào. Tình trạng này được chỉ huy bởi gene R điều hòa đặc điểm chống chịu và đáp ứng phản ứng quá mẫn^{5,6}. Mặc dù phát xạ photon sinh học không phụ thuộc vào ROS⁷, quá trình tạo ảnh của phương pháp này vẫn giúp chúng ta nghiên cứu các chu trình xâm nhập của mầm bệnh. Tuy nhiên, các nhà khoa học vẫn chưa lí giải được cơ chế phân tử của hiện tượng phát xạ này⁷. Tạo ảnh phát xạ có thể được tiến hành khi quá trình phát huỳnh quang yếu đã dần kết thúc.

Delayed fluorescence is a weak light emitted by healthy pre-illuminated plants (for review¹). In our previously published application note AN985_003 examples of fungal infections and drought affecting delayed fluorescence² are shown. Whereas delayed fluorescence is based on the amount of intact chlorophyll and decreases in the case of stress, the source of biophotonic emission is unknown and increases in stressed parts of the plant.

*The ultraweak biophoton emission is generated in response to stress such as wounding, salt stress or pathogen attacks. Its intensity is usually in a range less than 1000 photons/s*cm^{3,4} and correlates with the second burst of ROS, which various plants show in R-gene mediated resistance and hypersensitive reaction responses^{5,6}. Although biophoton generation is not dependent on ROS⁷ its imaging still offers a nondestructive and facile method to investigate pathogen related processes. The molecular mechanism underlying this light emission is unknown⁷. Biophoton imaging can be performed once delayed fluorescence has faded away.*

detect and identify

Phát huỳnh quang yếu và phát xạ photon sinh học đều là những phép chỉ thị xác định trạng thái sinh lý thực vật. Các kết quả mà chúng đưa ra đều rất đa dạng phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Cả hai phương pháp đều cần sử dụng một hệ tạo ảnh với máy ảnh CCD (linh kiện tích điện kép) có khả năng làm lạnh sâu với độ nhạy cao như dòng Berthold NightSHADE LB985 IK. Chúng tôi sử dụng một số tham số đã được thay đổi trong các công bố của Gould và cộng sự⁸, Bennette và cộng sự⁷, Flor-Henry và cộng sự³ để kiểm tra xem hệ thống của chúng tôi có khả năng tạo ảnh phát huỳnh quang chậm và phát xạ photon sinh học hay không. Qua kiểm nghiệm, máy ảnh của hệ tạo ảnh in vivo NightSHADE có thể nhận diện ánh sáng phát xạ với cường độ thấp một cách nhạy bén.

Delayed fluorescence and biophotonic emission act both as an indicator for the physiological state of a plant and vary based on environmental conditions. Both measurements require an imaging system with deeply cooled and very sensitive CCD (charge coupled device) cameras³ such as the Berthold Night-SHADE LB985 IK-models. We used modified parameters as described by Gould⁸ et al., Bennett⁷ et al. and Flor-Henry³ et al. to test our system for its ability to perform delayed fluorescence and biophoton imaging. We show that the camera system of the NightSHADE in vivo imaging system is sensitive enough to easily detect these low emissions.

Thao tác thí nghiệm

Experimental procedures

Đèn LED gây hiệu ứng chiếu sáng sau *LED afterglow*

Phát xạ photon yếu như DF và BE đều được tiến hành đo sau khi cây đã thích nghi một thời gian ngắn trong điều kiện tối để đảm bảo không còn tín hiệu huỳnh quang tức thời từ phân tử chlorophyll nữa. Hơn nữa, quá trình nhận diện yêu cầu sử dụng một khoang tối hoàn toàn kín sáng. Thêm vào đó, hệ NightSHADE còn cung cấp các bảng đèn LED (với bước sóng 470 nm, 660 nm, 730 nm và đèn LED trắng) để kích thích phân tử chlorophyll trước khi diễn ra quá trình nhận diện phát xạ kéo dài tới hàng giờ. Chúng ta phải đảm bảo quá trình thực hiện phép đo phát xạ photon sinh học với cường độ rất thấp không bị ảnh hưởng bởi hiện tượng phát sáng sau gây ra do những bảng đèn LED này. Tuy nhiên, các bóng đèn LED này thường có khả năng chiếu sáng kể cả sau khi đã tắt nguồn điện. Vậy nên, các lá gương được sử dụng để xác định thời gian chiếu sáng sau kéo dài bao lâu. Phép đo lượng ánh sáng lưu lại được tiến hành 5, 10, 20 và 60 giây sau khi tắt các bảng đèn LED. Cuối cùng, chiếu sáng sau được nhận diện trong vòng 60 giây với 2x2 pixel binning.

Low photon emissions such as DF and BE are measured after a short dark adaption of the plants to ensure that all prompt fluorescence of chlorophyll is gone. Furthermore an absolute light-tight dark chamber is needed for detection. In addition the NightSHADE offers LED-panels (470 nm, 660 nm, 730 nm and white LEDs) to excite chlorophyll followed by the detection of light emission up to hours. It has to be assured that during measuring time no afterglow of these LED panels is interfering with the light detection of the ultraweak photon emissions. However, since it is well-known that some LEDs will glow after switching off the electrical power, mirror foil was used to determine how long this afterglow is detectable. The measurement of remaining light was performed 5, 10, 20 and 60 seconds after switching of the LED panels. Afterglow was than detected for 60 s with a 2x2 pixel binning.

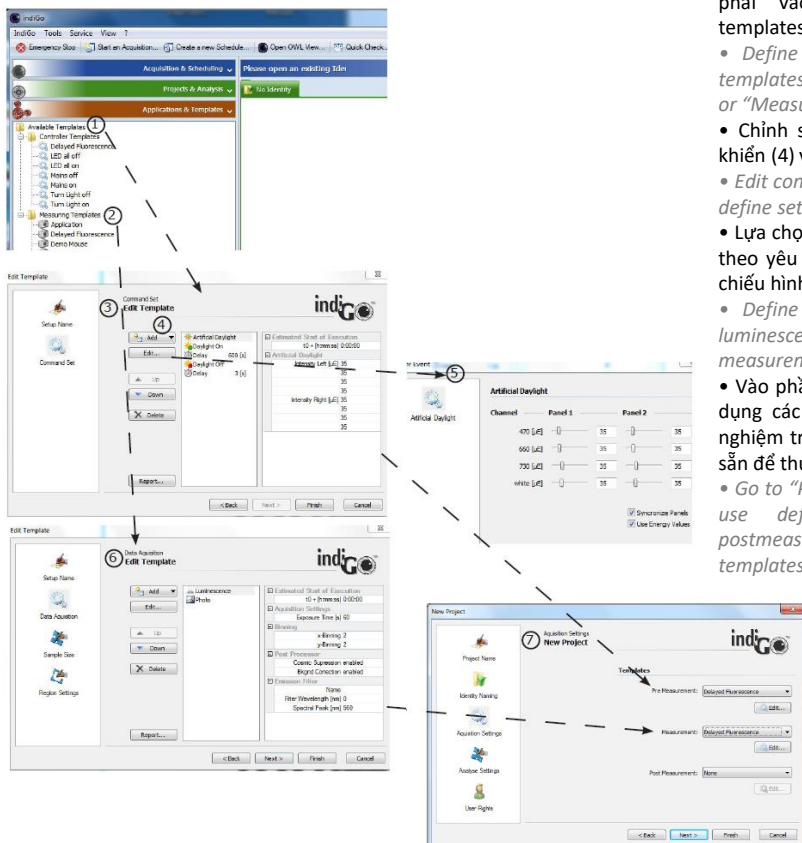
Phép đo phát huỳnh quang chậm Delayed Fluorescence Measurement

Các tham số sử dụng trong thí nghiệm được tham khảo từ công bố của Gould và cộng sự⁸ nhằm phát hiện tín hiệu phát huỳnh quang chậm từ *Arabidopsis thaliana*. Lá của *Carpinus betulus* được chiếu sáng với 35 μE trong vòng 10 phút. Cường độ ánh sáng phía trên mẫu được xác định bởi máy đo Einsteinmeter LI-250 (Licor). Các kênh đèn LED ở bước sóng 470 nm, 660 nm và 730 nm đều được điều chỉnh sang giá trị 35 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Sau khi tắt đèn, có một quãng nghỉ dài 10 hoặc 3 s diễn ra trước khi phép đo được tiến hành. Tín hiệu DF được nhận diện trong vòng 60 s sau đó với 2x2 pixel binning. Chúng tôi thu được một bức ảnh đen trắng với thời gian tiếp xúc 0.1 s và cường độ 10% sau phép đo DF (Hình 1).

Parameters were used as defined by Gould et al.8 for detecting delayed fluorescence in Arabidopsis thaliana. Carpinus betulus leaves were illuminated with 35 μE for 10 min. The light intensity just above the sample was determined using the Einsteinmeter LI-250 (Licor). Setting the LED channels of 470 nm, 660 nm and 730 nm to 35 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ each. After turning off the light a 10 s or alternatively a 3 s delay was inserted before the measurement. DF was then.

Hình 1. Các bước cài đặt phép đo và hệ thống chiếu sáng đèn Led bằng phần mềm indiGO: cài đặt đo DF bằng phần mềm indiGO

Figure 1. Setting up a measurement combined with LED illumination with IndiGO step by step: IndiGO Settings for measuring DF:



- Tạo mới mẫu đối chứng (1) và mẫu đo (2) (bấm chuột phải vào "Controller templates" hoặc "Measuring templates")
- Define new control templates (1) and measurement templates (2) (right mouse click on "Controller Templates" or "Measuring Templates").
- Chỉnh sửa cài đặt mẫu đối chứng (3): thêm lệnh điều khiển (4) và tùy chỉnh cài đặt cho từng thông số (5)
- Edit control templates (3) : add control commands (4) and define settings for each (5)
- Lựa chọn các phương pháp đo và điều chỉnh các thông số theo yêu cầu (6). Ví dụ: lựa chọn phép đo phát quang và chiếu hình ảnh
- Define measurements and required settings (6) e.g. luminescence measurement and photo
- Vào phần "Dự án và phân tích" (7), tạo dự án mới và sử dụng các tham số điều khiển có sẵn tương ứng với thí nghiệm trước và sau khi đo, sử dụng tham số đo lường có sẵn để thực hiện phép đo.
- Go to "Projects & Analysis" (7) , create a new project and use defined control templates for "pre- and postmeasurement" activities, use defined measurement templates for "measurement"

Phát xạ photon sinh học

Biophotonic emission

Sau phép đo phát huỳnh quang chậm, lá cây được giữ ở điều kiện tối hoàn toàn trong vòng 30 phút bởi tín hiệu BE thường bị át bởi tín hiệu DF từ 5-10 phút. Với 10 phút nhận diện, chúng tôi thu được ảnh 8x8 pixel binning. Ảnh đen trắng thu được sau phép đo DF có thời gian tiếp xúc 0.1 s, cường độ sáng 10%.

Ảnh chụp

Photographic image

Máy ảnh kỹ thuật số Canon G11 được sử dụng để chụp ảnh lá cây đa màu sắc. Diện tích lá có tín hiệu phát xạ photon sinh học cao nhất được ghi lại bởi ảnh tái hiện tiêu chuẩn hóa và ảnh này được điều chỉnh về cùng một kích thước sử dụng Photoshop Elements v4.

Vật liệu

Material

- NightSHADE LB 985 IKflu, số hiệu 4001
- Phần mềm indiGO phiên bản 2.0.1
- Các bảng đèn LED
- Light-meter LI-250 (LI-COR)
- Photoshop Elements v4 (Adobe)
- Máy ảnh kỹ thuật số Canon G11

After the measurement of delayed fluorescence the leaves were kept in absolute darkness for 30 minutes due to the observation that BE is masked by DF for 5-10 minutes³. An image was taken with 10 min detection time using an 8x8 pixel binning. A black and white photo was taken with 0.1 s exposure time, 10% intensity after the DF measurement.

A Canon G11 digital photo camera was used to take a multi-colour image of the leaves. The area of the highest biophotonic emission was marked by standardizing retrieved photos and measurement images to the same size using Photoshop Elements v4.

- *NightSHADE LB 985 IKflu, serial number 4001*
- *indiGO software v. 2.0.1*
- *LED panels*
- *Light-meter LI-250 (LI-COR)*
- *Photoshop Elements v4 (Adobe)*
- *Canon G11 digital camera*

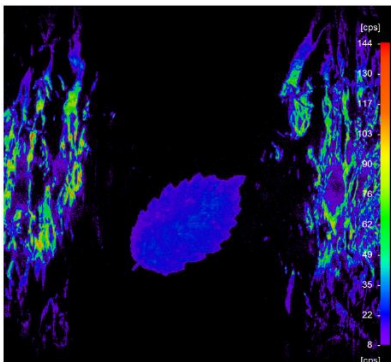
Kết quả

Results

**Đèn LED gây hiệu ứng chiếu sáng sau
LED afterglow**

Đèn LED trắng gây ra hiện tượng chiếu sáng sau kéo dài tới 60 s sau khi tắt nguồn điện làm chấn tít hiệu DF (Hình 2). Đèn LED xanh (470 nm), đỏ (660 nm) hoặc đỏ hồng ngoại (730 nm) không tạo ra hiệu ứng này (không hiển thị dữ liệu).

White LEDs show an afterglow after switching of the electrical power for up to 60 s covering the DF signal (Figure 2). Blue (470 nm), red (660 nm) or IR-red (730 nm) LEDs do not show this effect (data not shown).

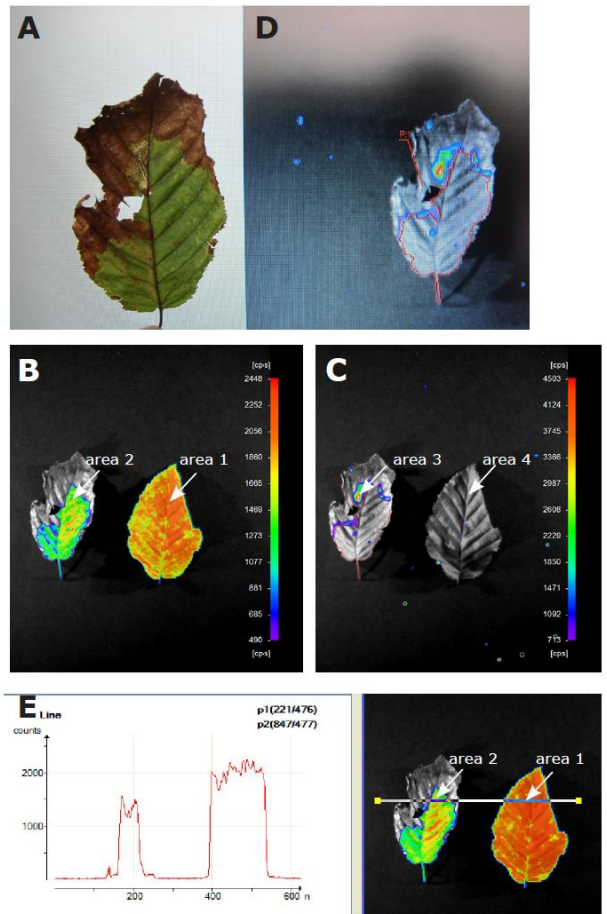


Hình 2. Đèn LED gây hiệu ứng chiếu sáng sau có thể được thấy ở cạnh trái và phải ảnh

Figure 2. LED afterglow can be seen at the left and right side of the image

Hình 3. Ở cả hai phép đo DF và BE, chúng tôi sử dụng một mẫu lá tươi tốt và một mẫu lá úa nâu (A). Tín hiệu DF mạnh hơn ở mẫu lá tươi tốt (phải) so với ở mẫu lá bị thương tổn, úa nâu (trái) (B). Tín hiệu BE chỉ có thể được thấy ở phần lá bị thương tổn có màu ngả nâu. Có thể ở những vùng thương tổn này, số lượng tế bào bị stress chiếm phần nhiều hơn so với tế bào khỏe (C). Hình E biểu diễn cách xác định số lượng trong phần diện tích đỉnh sử dụng công cụ đường kẻ (xem bảng 1).

Figure 3. For DF and BE measurements a healthy leaf and a brownish leaf (A) are used. B. DF is much stronger in a healthy leaf (right) than in the brownish, damaged leaf (left). The BE signal can only be seen in the part of the damaged leaf which is slightly brown, probably, indicating that this area still consist of living but highly stressed cells. Figure E shows how counts in peak areas were determined using the line tool (see table 1).



Ảnh DF

DF image

DF được đo sau 10 phút tiếp xúc ánh sáng ở $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Tắt đèn LEDs mất khoảng 2 s. Tính cả thời gian lưu ánh sáng mất 3 s, phép đo DF bắt đầu khoảng 5 s sau khi tắt đèn. Nhờ vậy mà tín hiệu thu được rất mạnh với cường độ cao hơn gấp 140% so với cường độ thu được nếu bắt đầu phép đo sau 10 s (không hiển thị dữ liệu). Hơn nữa, nếu nâng cường độ sáng của đèn LED lên tới $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ thì tín hiệu DF thu được cũng không thể tăng thêm (không hiển thị dữ liệu). Điều này chứng tỏ rằng hệ thống đã bão hòa với cường độ chiếu sáng $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Đối với lá cây tươi tốt như ở hình 3B, ta có thể thấy tín hiệu DF phát ra trên toàn bộ bề mặt lá chứng tỏ sự bao phủ đồng đều của lượng phân tử chlorophyll.

Ảnh BE

BE image

Cả hai lá đều cho thấy cường độ phát xạ thấp hơn nhiều so với cường độ thu được ở phép đo DF (Hình 3C). Cường độ cao nhất được phát hiện ở vùng mà lá cây bị tổn thương, nhưng không phải tại vị trí mô thực vật khô hoàn toàn (Hình 3D). Hiện tượng này xảy ra ở phần rìa của lá cây xanh còn tươi tốt và phần lá bị úa nâu.

DF was measured after a 10 min light exposure with $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Turning off the LEDs took about 2 s. Together with the 3 s delay time measurement of DF was started around 5s after turning off the light resulting in strong signals, showing a 140% higher intensity than a 10 s delay (data not shown). Furthermore increasing the LED intensity up to $140 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ did not result in a higher DF signal (data not shown) indicating that the system is already saturated at the $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ irradiation. As shown in figure 3B healthy leaves show DF over the whole leaf area, reflecting homogenous chlorophyll levels.

Both leaves show emission with much lower intensities than for the DF measurement (fig 3C). The highest intensity is detectable in an area where the leaf has damaged, but not complete dry tissue (figure 3D). This occurs along the border of healthy green and dry brown areas of the leaf.



	Số lượng (đỉnh) <i>Counts</i> <i>(Peak)</i>	Thời gian nhận diện <i>Detection time</i>	Binning	CPS (đỉnh) <i>CPS</i> <i>(Peak)</i>	Điều chỉnh sang pixel binning 1x1 <i>Adjusted to pixel binning 1x1</i>
DF (diện tích 2)	1500	60 s	2 x 2	25	6.25
DF (diện tích 1)	2000	60 s	2 x 2	33.3	8.3
DF (diện tích 4)	500	600 s	8 x 8	0.83	0.013
DF (diện tích 3)	5000	600 s	8 x 8	8.3	0.13

Bảng 1. Độ cao tín hiệu thu được ở lá cây tươi tốt và ở lá cây bị thương tổn sau phép đo DF và photon sinh học (quan sát hình 3). Tín hiệu DF cao hơn ở phần lá tươi tốt (phần diện tích 2) còn tín hiệu phát xạ photon sinh học lại mạnh hơn ở phần lá bị thương tổn (phần diện tích 3).
Table 1. Signal heights in healthy and damaged parts of leaves for DF and biophotons (see Figure 3). DF signal is higher in healthy areas (area 2) whereas biophoton emission is high in damaged areas (area 3)

Kết luận

Conclusion

Phương pháp tạo ảnh DF và BE là những công cụ hữu dụng giúp giám sát trạng thái stress ở thực vật mà không can thiệp. DF là quá trình đã được nghiên cứu sâu từ trước trên các sinh vật có khả năng quang hợp¹. Cây được chuyển vào trong tối sau đó phân tử chlorophyll được kích thích đã tạo ra hiện tượng phát xạ photon. Do đó phương pháp hậu phát sáng này cho phép chúng ta xác định trạng thái phân tử chlorophyll và quang hệ ở thực vật một cách nhanh chóng và đơn giản. Hơn nữa, lượng DF được điều khiển bởi một hệ thống sinh học rất tinh vi⁸. Điều này cũng đồng nghĩa với việc phương pháp DF cũng có thể ứng dụng để xác định nhịp điệu sinh học rất dễ dàng với năng suất cao mà không cần tới gen chỉ thị.

DF and BE imaging are useful methods to monitor the stress status of a plant in a non-invasive way. DF is a long-known and well-studied process of photosynthetic organisms¹. Photon emission results from excited chlorophyll following the transfer of plants into the dark. Therefore this post-illumination emission offers a fast and simple way to determine the status of the chlorophyll and the photosystem in plants. Furthermore the level of DF is under a robust circadian control⁸. This means DF also provides a simple and high-throughput way to measure circadian rhythms without the need of reporter genes.

detect and identify

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ra rằng hệ tạo ảnh in vivo thực vật NightSHADE của chúng tôi có khả năng đo tín hiệu DF. Với các thông số cài đặt nêu trong công bố của Gould và cộng sự⁸, chúng tôi có thể dễ dàng nhận diện DF. Cường độ của nó phụ thuộc vào trạng thái chlorophyll ở thực vật (Hình 3). Thêm vào đó, dòng máy NightSHADE cung cấp các bảng đèn LED sử dụng để kích thích quang hệ ở thực vật. Nhưng lưu ý rằng DF sẽ không thể thực hiện được nếu sử dụng đèn LED trắng do hiệu ứng chiếu sáng sau kéo dài tới 60 s mà loại đèn này gây ra. Theo Gould và cộng sự, tín hiệu phát huỳnh quang chậm kết thúc ngay sau 60 s, do đó không còn nhận diện được nữa. Chúng tôi có thể xác minh được thời gian tồn tại rất ngắn của tín hiệu DF. Trong thí nghiệm này, tín hiệu đã trở nên rất yếu chỉ sau 10 s.

Trái ngược với phát xạ DF, nguồn phát BE hay còn được gọi là phương pháp phát quang sinh học cực yếu vẫn chưa được xác định mặc dù Birtic và cộng sự có chỉ ra rằng oxy hóa chất béo có liên quan tới quá trình tạo BE⁹. Sử dụng hệ tạo ảnh NightSHADE, chúng tôi phát hiện thấy tín hiệu phát xạ photon sinh học tăng đáng kể ở những phần lá cây bị thương tổn và úa nâu. Tín hiệu phát xạ BE tăng được quan sát thấy khi cây đáp ứng với các tác nhân như nhiễm mầm bệnh, stress độ mặn và thẩm thấu, thương tổn cơ học và vết bầm trên cây³. Các quá trình sản sinh ROS cũng gây ra phát xạ photon sinh học. Đặc tính này cho thấy phương pháp BE đóng vai trò như một dấu hiệu sinh học xác định trạng thái stress oxy hóa ở thực vật⁹.

Here we have shown that our in vivo plant imaging system NightSHADE is capable of measuring DF. Using the settings of Gould et al.⁸ we could easily detect DF and its intensity was dependent on the chlorophyll status of the plant (figure 3). In addition the NightSHADE offers LED panels, which can be used to excite the photosystem, but noticeably DF cannot be performed using white LEDs due to their long afterglow up to 60 s. According to Gould et al. the signal of delayed fluorescence is gone after 60 s and therefore not detectable anymore. We could verify this short lifetime of DF. In our experiments it was already dramatically reduced after 10 s.

In contrast to DF emission the source of BE, also called ultra-weak bioluminescence is unknown, although Birtic et al. could show that lipid oxidation is involved in the generation of BE⁹. Using the NightSHADE system we found the biophoton emission being significantly increased in brown and damaged parts of a leaf. The increase in BE emission has been observed in response to pathogen infections, salt and osmotic stress, mechanical damage and wounding³. Biophoton emission seems to be induced by the same conditions inducing ROS production, making it an internal marker of oxidative stress⁹.

Tại nghiên cứu này, chúng tôi đã xác minh được cường độ tín hiệu phát xạ DF tương đối mạnh hơn so với cường độ tín hiệu BE. Nếu xét tới các thông số về thời gian nhận diện và pixel binning thì chúng tôi cần áp dụng một hệ số điều chỉnh bằng 160 để so sánh cả hai phép đo. Khi so sánh hai đỉnh cao nhất của phép đo DF (diện tích 2) và BE (diện tích 3) chúng tôi nhận thấy tín hiệu phát xạ của DF cao hơn tín hiệu phát xạ photon sinh học gấp khoảng 50 lần.

Nói tóm lại, cả hai phép đo DF và BE đều là những phương pháp tiềm năng có tính phổ quát và đem lại hiệu suất cao trong việc giám sát nhịp điệu sinh học, nhiễm mầm bệnh, đáp ứng chống chịu phụ thuộc vào gen R, hạn hán hay những tác nhân stress khác. Mặt khác, khi ứng dụng phương pháp BE vào phép đo trạng thái oxy hóa chất béo trên thực vật hay các sinh vật khác chúng ta không cần phải lo nghĩ gì⁹. Dòng máy NightSHADE là một công cụ rất thích hợp để tiến hành hai phép đo này và có khả năng phát hiện cường độ ánh sáng ở ngưỡng rất thấp nhờ máy ảnh CCD tích hợp trong hệ thống rất nhạy. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã thiết lập phần mềm indiGO để tiến hành đo theo cả hai phương pháp một cách tự động với thời gian nghỉ đã cài đặt trước (Hình 1). Nhờ tính năng phân tích của phần mềm mà cường độ DF và BE được dễ dàng xác định.

In our experiments we were able to confirm that DF emission was relatively strong compared to the levels of BE. Taking different detection times and pixel binning settings into consideration (table 1), a correction factor of 160 has to be applied to compare both types of measurements. When comparing the highest peaks of DF (area 2) and BE (area 3) respectively, the emission of DF is about 50 times higher than that of biophotons.

In summary DF and BE measurements show a great potential as universal, high-throughput methods to monitor circadian rhythm, pathogen infestation, R-gene dependent resistance responses, drought and other stresses. Furthermore it has been claimed that BE monitoring might be a nonperturbing measurement of the lipid oxidation status of plants and other organisms⁹. The NightSHADE is a well-suited instrument to perform all of these measurements and detect such low light intensities due to its sensitive CCD-camera. In our experiments we programmed the IndiGO software to perform both measurements in an automatic way with a specified delay time (figure 1). Intensities of DF and BE were easily determined using the analysis function of the software.

Tài liệu tham khảo

Literature

1. **Jursinic (ed.) (1986):** Delayed Fluorescence: Current Concepts and Status. New York: Academic Press
2. **Hennecke et al. (2011):** Measurement of Delayed Fluorescence in Plants - a Monitoring System for Stress Factors. Berthold Technologies AN985_003
3. **Flor-Henry et al. (2004):** Use of a highly sensitive two-dimensional luminescence imaging system to monitor endogenous bioluminescence in plant leaves. *BMC Plant Biology* 4:19
4. **Pitzschke et al. (2006):** Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling* 8; 1757-1764
5. **Torres et al. (2006):** Reactive Oxygen Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* 141 (2); 373-378
6. **Allan et al. (1997):** Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *The Plant Cell* 9; 1559-1572
7. **Bennett et al. (2005):** Biophoton Imaging: A Nondestructive Method for Assaying R Gene Responses. *MPMI* 18 (2); 95-102
8. **Gould et al. (2009):** Delayed fluorescence as a universal tool for the measurement of circadian rhythms in higher plants. *The Plant Journal* 58: 893-901
9. **Birtic et al. (2011):** Using spontaneous photon emission to image lipid oxidation patterns in plant tissues. *Plant Journal* 67 (6); 1103-15