

# Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse und Fluoreszenzspektralanalyse

## Einsatzmöglichkeiten im Gartenbau und in der Landwirtschaft

*Preiswertere, flexibel einsetzbare Messsysteme sowie rasante Fortschritte in der Lasertechnik und verbesserte Messmethoden erweiterten in den letzten Jahren das Anwendungspotenzial der zerstörungsfreien Fluoreszenzanalyse in der gartenbaulichen und landwirtschaftlichen Forschung. So sind seit kurzem leistungsfähige Bildanalysesysteme kommerziell verfügbar. Damit sind zunehmend sichere Ergebnisse in Produktqualitätsbewertung, Sortierung, Sortenscreening und Pflanzenzüchtung zu erzielen. Grundlagen sowie einige der bislang noch bestehenden Probleme in der Anwendung werden diskutiert.*

Dr. Werner B. Herppich und Dr. Manuela Zude sind Mitarbeiter der Abteilung Technik im Gartenbau am Institut für Agrartechnik Bornim e. V., Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam (Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr.-Ing. J. Zanke); e-mail: [wherp-pich@atb-potsdam.de](mailto:wherp-pich@atb-potsdam.de)

### Schlüsselwörter

Bildanalyse, Chlorophyllfluoreszenzanalyse, Fluoreszenzspektralanalyse, Produktqualität, Photosynthese

### Keywords

Image analysis, chlorophyll-fluorescence analysis, fluorescence spectral analysis, photosynthesis, product quality

### Literatur

Literaturhinweise sind unter LT 02215 über Internet <http://www.landwirtschaftsverlag.com/landtech/localliteratur.htm> abrufbar.

Aktuell wird im landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Bereich eine lückenlose Qualitätskontrolle von der Produktion bis zum Verbraucher gefordert. Nur eine moderne, produktorientierte, auf chemischen und physiologischen Produkteigenschaften gegründete Qualitätsdefinition erlaubt eine objektive Qualitätsbeschreibung. Dabei sind die Anforderungen an Exaktheit und Reproduzierbarkeit der einsetzbaren Parameter, vor allem aber an die dafür genutzte Methodik hoch. Die Fortschritte in Elektronik, Datenverarbeitungstechnik und Naturwissenschaften beschleunigten die Entwicklung von neuen, zerstörungsfrei arbeitenden Testmethoden und -systemen, deren Praxiserprobung derzeit stattfindet [1].

Bei frischen Produkten kann man davon ausgehen, dass nur Produkte mit hoher (potenzieller oder tatsächlicher) Stoffwechselaktivität auch eine hohe (innere) Qualität besitzen. In grünen Pflanzengewebe ist die Photosynthese ein wichtiger physiologischer Prozess, der viele biophysikalische und biochemische Reaktionen verbindet und in vielfältiger Weise von internen und externen Reizen beeinflusst wird. Das macht die Bestimmung der Photosyntheseaktivität sowie deren Reaktion auf unterschiedliche Stressoren zu einem potenten Werkzeug für die Bewertung der Produktqualität. Die Chlorophyllfluoreszenzanalyse liefert zerstörungsfrei schnelle und/oder komplexe Informatio-

nen über die Leistungsfähigkeit und die Intaktheit der Photosynthese [2, 3]. Einfach zu bedienende Fluoreszenzanalysemessgeräte [2] sowie der Einsatz moderner Bildanalysetechniken machen diese Methode zu einem vielseitigen Indikator der physiologischen Aktivität chlorophyllhaltiger Pflanzen und Pflanzenteile und haben zu ihrer Verbreitung in der Gartenbauforschung geführt [3, 4].

### Chlorophyllfluoreszenzanalyse

In den Chloroplasten grüner pflanzlicher Gewebe wird bei „ungestörter“ Photosynthese Lichtenergie von Chlorophyllen absorbiert und primär in biochemisch verwertbare Energie umgewandelt (Photochemie). Diese wird hauptsächlich für die Synthese von Zuckern aus Kohlendioxid und Wasser genutzt. Ein geringer Anteil des absorbierten Lichtes wird von den Photosynthesepigmenten als Wärme und etwa 2 bis 3 % wieder als Fluoreszenzlicht abgegeben.

Wird in einer Stresssituation (Hitze, Kälte, Frost, Trockenheit, Sauerstoffmangel, Pathogeninfektion, Herbizideinsatz,...) bei un- verminderter Einstrahlung die photochemische Energienutzung gestört, verlangsamt oder ganz unterbunden, kommt es zu einem „Energierückstau“. Dies induziert eine Serie von Schutzmechanismen, die zu einer erhöhten Umwandlung in Wärme, letztlich aber zu verstärkter Fluoreszenz führen [2].

*Bild 1: Typischer Verlauf einer Chlorophyllfluoreszenzmessung. Auf ein 10 min verdunkeltes Produkt wird nach Einschalten des Messlichtes ein sättigender Lichtpuls gegeben, der die maximale Fluoreszenz auslöst. Danach wird das Objekt mit kontinuierlichem Licht bestrahlt und in definierten Abständen werden weitere Sättigungspulse gegeben.*

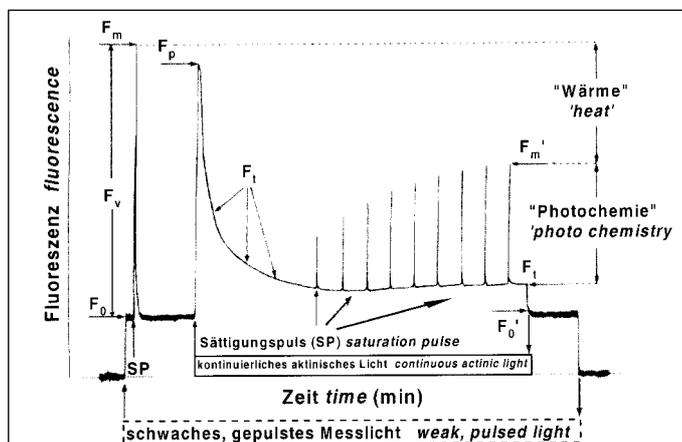


Fig. 1: Example of a typical fluorescence transient as recorded with a PAM-fluorometer.

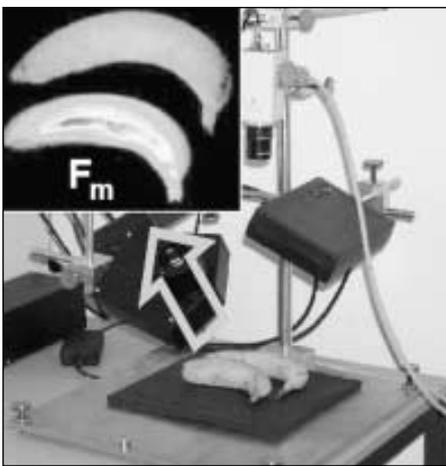


Bild 2: Das Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse-system FluorCam (Photon Systems Instruments) besteht aus LED-Einheiten, Halogensättigungspulsampe, CCD-Kamera und Steuereinheit. Die Chlorophyllfluoreszenzaufnahmen lässt den geringen grünen Farbanteil der nahezu gelb ausgefärbten Banane (unten) deutlich erkennen.

Fig. 2: The chlorophyll-fluorescence imaging system FluorCam (Photon Systems Instruments) consists of LED-panels, halogene saturation-puls lamp, CCD camera and control unit. The very small green parts of the partially ripe banana are easily visible in the lower chlorophyll fluorescence image.

Moderne Fluorometer [3] erfassen jedoch mehr als nur die kontinuierliche Fluoreszenz und gewinnen Informationen über Aktivität und Integrität des Photosyntheseapparates und der relativen Aktivität der Schutzmechanismen gewinnen. Je nachdem, welcher Parameter bestimmt werden soll, ist ein angepasstes Messprotokoll notwendig.

Für eine umfassende Analyse (Bild 1) wird das Produkt für einige Minuten verdunkelt und damit die Wärmeabgabe „abgeschaltet“ und die Photochemie in den „Ruhezustand“ versetzt. Belichtet man nun mit einem schwachen, nicht photosynthetisch-aktiven Messlicht, wird die sogenannte Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) induziert, ohne dass es zu einer photochemischen Arbeitsleistung kommt. Ein kurzer Lichtimpuls sehr hoher Intensität (Sättigungspuls) regt kurzzeitig alle Chlorophyllmoleküle an. Da zu diesem Zeitpunkt weder die Photochemie noch die Wärmeumwandlung aktiv sind, bleibt nur die Fluoreszenz, um die aufgenommene Energie abzugeben. Damit wird die Fluoreszenz ( $F_m$ ) maximal. Bei anschließender kontinuierlicher Belichtung spiegelt die charakteristische Änderung der Fluoreszenz von  $F_0$  über  $F_p$  bis zum *steady state* Signal ( $F_s$ ) die Feinregulierung der Photosynthese wider. Nach Erreichen von  $F_s$  induziert ein Sättigungslichtpuls nur noch ein intermediäres Maximum ( $F_m'$ ), da bei Dauerbelichtung die Wärmeabstrahlung aktiv ist. Andererseits zeigt der Anstieg auf  $F_m'$ , dass ein Teil der möglichen Fluoreszenz normalerweise durch die photochemische Arbeitsleistung unterbunden bleibt. Durch geeignete Verrechnung der Fluoreszenzsignale kann man den relativen Anteil

der Photochemie sowie der Wärme an der Nutzung der absorbierten Lichtenergie abschätzen.

Während eine komplette Fluoreszenzanalyse (Bild 1) etwa 30 Minuten dauert, gewinnt man durch die Messung von  $F_s$  und  $F_m'$  schnell wertvolle Ergebnisse. So ist der Quotient  $(F_m' - F_s)/F_m'$  ein Maß für die aktuelle Effizienz der Photochemie. Misst man noch die absorbierte Photonenmenge, kann man aus dem Quotient die Elektronentransportrate bestimmen. Das Verhältnis der variablen  $(F_m' - F_0)$  zur maximalen Fluoreszenz  $F_m$  wiederum beschreibt die maximale photochemische Effizienz. Da nur ein intaktes System maximal effizient sein kann, erlaubt dies Aussagen über die Integrität des Phototheseapparates.

Allerdings findet sich oft eine ausgeprägte räumliche Dynamik in der Stressreaktion [4]. Eine Nichtbeachtung dieses Effektes erhöht die Variabilität der Ergebnisse und kann zu Fehlinterpretationen führen. Die Bildanalyse [6] und die zeitaufgelöste Spektralanalyse [7] bieten hier sichere Ansätze.

### Chlorophyllbildanalyse

Verschiedene, selbstgebaute Systeme wurden schon mit Erfolg eingesetzt [5]. Seit einiger Zeit sind kommerzielle Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse-systeme erhältlich [4]. Damit sind nahezu alle bisher angesprochenen Probleme mit relativ hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu untersuchen.

Auch sehr geringe Chlorophyllgehalte werden durch die Fluoreszenzanalyse empfindlich nachgewiesen. Dies ist in Bild 2 an dem Vergleich zweier Bananen verdeutlicht. Die ganz ausgereifte und ausgefärbte Frucht ergibt nur ein schwaches, gleichmäßiges Fluoreszenzsignal. Bei der zweiten, die ebenfalls nur einen sehr geringen, kaum erkennbaren grünen Pigmentanteil aufwies, lässt sich eine deutliche Chlorophyllfluoreszenz ( $F_m$ ) lokal in einigen Teilen der Frucht feststellen. Somit bietet sich dieses System etwa zu Sortierung nach oder Erkennung von Reifezuständen an [6].

### Laser-induzierte Fluoreszenzspektralanalyse (LIFS)

Beispielhaft wurden gesunde Äpfel im Labor bis zum Bruch des Fruchtgewebes mechanisch belastet und das Auftreten einer dunklen Druckstelle nach 40, 60, 135 und 180 Minuten mit Hilfe der LIFS aufgezeichnet. Hierzu wurde der intakte Apfel einer Strahlung im Wellenlängebereich 351 bis 364 nm (Argon Ionen Laser) ausgesetzt. Die dadurch angeregten Chlorophylle emittierten wiederum Strahlung im dunkelroten Wellenlängenbereich, ebenfalls angeregte

phenolische Verbindungen dagegen im blau-grünen Wellenlängenbereich. Veränderungen der Chlorophyll- und Polyphenolgehalte bei Ausbildung der Druckstellen können durch die Veränderung der Fluoreszenzintensität in den spezifischen Wellenlängen gemessen werden. Für die Interpretation der Ergebnisse sind multivariate Auswerteverfahren notwendig, da die Lichtemission von verschiedenen Molekülgruppen gleichzeitig erfasst wird [7]. Die Auswertung der Fluoreszenzspektren zeigt eine Clusterung, bedingt durch die Zunahme der fluoreszenten Polyphenole im Gewebe während der Ausbildung der sichtbaren Druckstelle im Verlauf der Messung (Bild 3). Fluoreszenzspektren im blau-grünen Wellenlängenbereich können dementsprechend zur nicht-invasiven Untersuchung von physiologischen Prozessen wie auch zur zerstörungsfreien Qualitätskontrolle eingesetzt werden [8]. Speziell hierfür besteht allerdings noch erheblicher Forschungsbedarf.

### Fazit

Chlorophyllfluoreszenzanalyse und Fluoreszenzspektralanalyse sind hervorragende, wenn auch nicht völlig problemfreie Möglichkeiten zur Untersuchung der Qualität oder der Stressreaktionen gartenbaulicher Produkte. Für eine umfassende Qualitätsanalyse ist die Wahl der richtigen fragestellungsbezogenen Messparameter wichtig. Biotische und abiotische Faktoren können die Aussage und Interpretation beeinflussen, wenn ihre Auswirkung nicht beachtet wird.

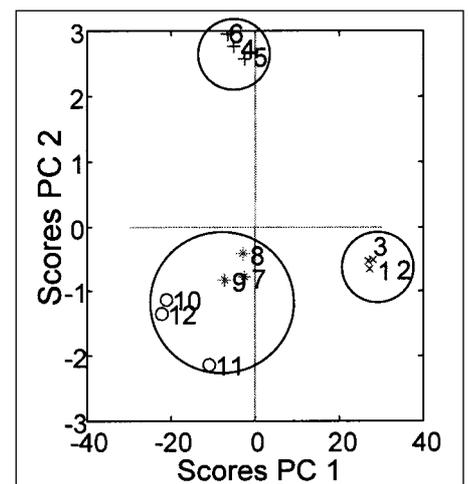


Bild 3: Hauptkomponentenanalyse einer LIFS (400 – 580 nm) von mechanisch belasteten Äpfeln ( $n = 3$ ) während der Ausbildung einer Druckstelle; 1-3 = 40, 4-6 = 60, 7-9 = 135, 10-12 = 180 Minuten nach Belastung.

Fig. 3: The PCA of a LIFS (400-580 nm) of mechanically stressed apples ( $n = 3$ ) during the formation of a bruising damage (1-3 = 40, 4-6 = 60, 7-9 = 135, 10-12 = 180 min after impact)