

Сезонные вариации флуоресценции сосны обыкновенной по данным измерений на Сибирской лидарной станции

В.В. Зуев, Н.Е. Зуева, М.В. Гришаев*

*Институт оптики атмосферы им. В.Е. Зуева СО РАН
634021, г. Томск, пл. Академика Зуева, 1*

Поступила в редакцию 2.10.2008 г.

Представлены спектры флуоресценции сосны обыкновенной (*Pinus silvestris*) за период 01.07.2007–31.05.2008 гг., полученные на Сибирской лидарной станции в режиме реального времени в натуральных условиях методом индуцированной лазером флуоресценции. Приведена структурная схема лидара, позволяющего получать спектры флуоресценции взрослых древесных растений. Показано, что в течение вегетационного периода в спектре присутствуют два максимума, расположенные в области дальней красной (F_{735}) и в существенно меньшей по интенсивности области красной F_{689} флуоресценции. Установлено, что максимум в полосе F_{689} регистрируется только в течение вегетационного периода. Показано, что наибольшая изменчивость параметра F_{735}/F_{689} , характеризующего количество хлорофилла, наблюдалась в течение летнего периода, а минимальная – в сентябре 2007 г. Для периода начала вегетации 2008 г. отмечен достаточно быстрый рост отношения F_{735}/F_{689} с отсутствием выраженных флуктуаций.

Ключевые слова: спектры флуоресценции, монохроматор, флуктуации, вегетационный период, хлорофилл.

Введение

Существенные климатические и биосферные изменения, происходящие в последнее время в глобальном масштабе, являются основной темой научных и политических форумов, в том числе и на высшем уровне. Однако прогноз развития событий неоднозначен и проблема его достоверности по-прежнему остается остро актуальной. Основная причина состоит в недостаточной изученности механизмов происходящих явлений и, как следствие, в ограничении числа параметров существующих климатических моделей.

Наиболее значимым фактором климатических изменений является рост концентрации углекислого газа (CO_2) в земной атмосфере за последние 150 лет. На суше сток диоксида углерода из атмосферы осуществляется главным образом за счет фотосинтеза в наземной растительной биоте. Значительную роль в стабилизации углеродного обмена в биосфере играют лесные массивы умеренного пояса Северного полушария, к нарушениям которых биосфера Земли наиболее чувствительна [1, 2]. В связи с этим изучению природных и антропогенных факторов, оказывающих влияние на процесс фотосинтеза растений, в последнее время уделяется существенное внимание.

Одним из методов исследования состояния фотосинтетического аппарата растений является метод

индуцированной лазером флуоресценции (ИЛФ). Основное его преимущество заключается в том, что, представляя собой метод неразрушающего контроля и обеспечивая тем самым существенный выигрыш во времени, он позволяет дистанционно работать с живыми объектами, контролировать состояние растительности в реальном режиме времени и изучать эффекты мгновенного воздействия на фотосинтетический аппарат растений.

В рамках исследований воздействия факторов природного и антропогенного характера на фотосинтетические характеристики высших растений на Сибирской лидарной станции (СЛС) Института оптики атмосферы СО РАН начат цикл работ по изучению спектров флуоресценции взрослых древесных растений. Получать спектры флуоресценции в режиме реального времени методом ИЛФ позволило создание на СЛС флуоресцентного канала.

Характеристика флуоресцентного лидара

Для возбуждения фотосинтетической флуоресценции кроны взрослых деревьев, произрастающих в естественных условиях, в области спектра от 600 до 850 нм в эксперименте была использована длина волны излучения второй гармоники Nd:YAG-лазера 532 нм. Структурная схема лидара изображена на рис. 1, его параметры приведены в таблице.

Излучатель лазера, приемный телескоп и объектив с интерференционным фильтром конструктивно расположены на поворотном узле, который

* Владимир Владимирович Зуев (ref_zuev@iao.ru);
Нина Евгеньевна Зуева; Михаил Владиславович Гришаев.

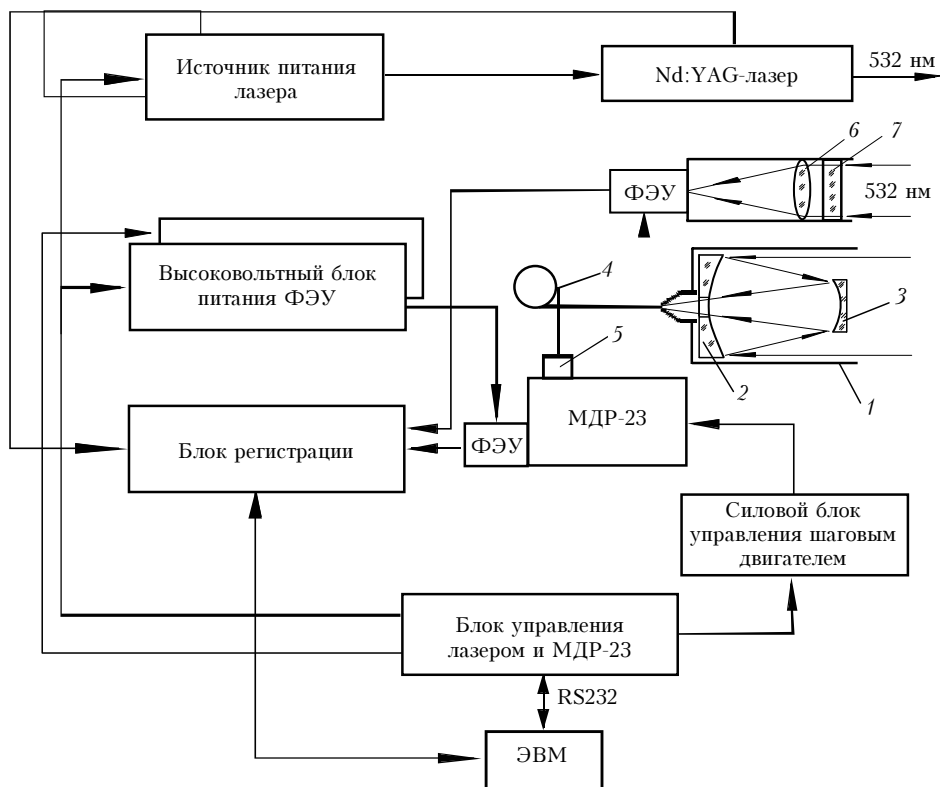


Рис. 1. Структурная схема флуоресцентного канала Сибирской лидарной станции: 1 – телескоп; 2 – большое параболическое зеркало; 3 – контротражательное зеркало; 4 – световод; 5 – согласующий узел; 6 – объектив опорного канала; 7 – интерференционный фильтр

позволяет плавно и с высокой точностью наводить оптическую систему на исследуемый объект по углу места и по азимуту. В фокусе приемной антенны помещен торец световода, другой конец которого установлен в щели монохроматора МДР-23.

Параметры флуоресцентного лидара	
<i>Передатчик</i>	
Длина волны излучения, нм	532
Энергия импульса излучения, мДж	150
Длительность импульса излучения, нс	9
Стабильность энергии излучения, %	2,5
Частота повторения импульсов, Гц	10
<i>Приемник</i>	
Диаметр приемной антенны, мм	250
Фокусное расстояние приемного телескопа, мм	900
Диаметр объектива опорного канала, мм	50
<i>Спектральный селектор</i>	
Монохроматор	МДР-23
Спектральное разрешение, нм	3
Диапазон спектральной перестройки МДР-23, нм	600–850
Шаг спектральной перестройки, нм	0,1
Время одного цикла спектральной перестройки, мин	20
Ширина фильтра опорного канала, нм	3
<i>Фоторегистратор</i>	
Фотоприемник	ФЭУ-62
Число каналов АЦП	2
Время преобразования АЦП, нс	25
Разрядность АЦП, бит	12
Буфер оперативной памяти, кбайт	32

В качестве источника опорного сигнала используется отраженный импульс зондирующего излучения от объекта исследования. Система фотоэлектронной регистрации сигналов опорного канала состоит из объектива, оптического интерференционного фильтра ($\lambda = 532$ нм), фотоэлектронного умножителя (ФЭУ-62), управляемого источника высокого напряжения, служащего для обеспечения необходимого режима работы ФЭУ.

Блок регистрации имеет в своем составе два идентичных канала. Каждый канал состоит из широкополосного усилителя (полоса пропускания от 0 Гц до 300 МГц), 12-разрядного АЦП с временем преобразования 25 нс и оперативного запоминающего устройства (ОЗУ) объемом 16 кбайт.

Блок управления лазером и МДР-23 реализован на микроконтроллере ADuC842. Программа микроконтроллера обеспечивает формирование импульсной последовательности для запуска лазера, устанавливает необходимое значение высокого напряжения и управляет работой шагового двигателя монохроматора.

Управляющая программа ЭВМ считывает текущее значение длины волны монохроматора, стартовое значение и выдает команду контроллеру для перестройки монохроматора. После установки заданной длины волны монохроматора контроллер ждет команду от управляющей программы на запуск лазера. Микроконтроллер, получив команду на запуск лазера, генерирует импульс длительностью 5 мкс

и посылает в источник питания лазера. Каждый импульс лазерного излучения формирует сигнал для запуска двухканального АЦП, который начинает производить оцифровку регистрируемого флуоресцентного сигнала и опорного сигнала одновременно. Данные преобразования записываются в ОЗУ. После заполнения ОЗУ данные передаются в память компьютера. Компьютер, получив данные, выдает команду контроллеру перестроить монохроматор на следующую длину волны, и процесс повторяется до тех пор, пока не достигнет конца установленного диапазона.

Постановка задачи

Известно, что в случае возбуждения флуоресценции лазерным излучением на длине волны 532 нм в спектре хлоропластов высших растений проявляются два максимума, положение которых при 20 °С, по разным оценкам, соответствует длинам волн 682 (670)–690 нм (красная флуоресценция) и 730 (720)–742 нм (дальняя красная флуоресценция).

При планировании эксперимента за основу нами были приняты следующие положения согласно [3–6]:

– Величина флуоресценции характеризует эффективность запаса энергии на первичных стадиях фотосинтеза. Флуоресценция тем сильнее, чем меньше поглощенной энергии используется для фотосинтеза.

– Сильное стрессовое воздействие на фотосинтетический аппарат растения приводит к изменению интенсивности флуоресцентного отклика.

– Флуоресцентный сигнал в области красной флуоресценции характеризует фотосистему (ФС) II, а в области дальней красной флуоресценции – ФС I. Способностью к флуоресценции обладают преимущественно молекулы хлорофилла *a*. При обычных условиях окружающей среды дополнительные пигменты в естественных системах практически не флуоресцируют.

– Величина отношения полос дальней красной и красной флуоресценции (ОПФ) является количественной характеристикой хлорофилла.

На начальном этапе исследований основная задача состояла в том, чтобы разработать методику регистрации спектров флуоресценции взрослого древесного растения в естественных условиях произрастания и по результатам регулярных измерений провести анализ полученных спектров.

Для отработки методики измерений в натуральных условиях в качестве объекта исследования была выбрана взрослая сосна (*Pinus silvestris*), что в некоторой степени обусловлено ее удобным расположением относительно измерительной аппаратуры. Однако прежде всего выбор объекта исследований связан с тем, что хвойные виды деревьев наиболее чувствительны к воздействию коротковолновой УФ-В-радиации, изменчивость приземного уровня которой определяется колебаниями обще-

го содержания озона [7]. Это позволяет использовать дендрохронологический сигнал хвойных для реконструкции данных о состоянии озоносферы до нескольких столетий в прошлое [8] вследствие их стрессового отклика на воздействие УФ-В-радиации. В свою очередь, спектры флуоресценции листового аппарата могут выступать в качестве чувствительного индикатора стресса растений.

Флуоресцентные характеристики листьев разных видов растений могут существенно различаться, поскольку на форму спектра флуоресценции хлорофилла влияет структурное состояние фотосинтетического аппарата растения. Характерной особенностью хвойных является отсутствие выраженного максимума сигнала в диапазоне 685–690 нм, который может проявляться лишь в виде плеча крыла более мощной полосы на 730–740 нм [9, 10]. Однако в условиях влияния неблагоприятных факторов интенсивность его может существенно возрастать [11]. Таким образом, решение задачи, связанной с возможностью идентификации максимума в области красной флуоресценции и последующего анализа его изменчивости, представляется весьма важным, поскольку именно ФС II ответственна за выделение кислорода и разложение воды. Количеством кислорода, выделенного с 1 дм² листовой поверхности за 1 ч, можно определять интенсивность фотосинтеза [3].

Результаты анализа спектров флуоресценции сосны обыкновенной (*Pinus silvestris*)

В течение всего периода наблюдений измерения проводились регулярно с 1 по 10 июля, а затем, в рутинном режиме, с 20 июля 2007 г. по настоящее время. Одним из основных факторов, оказывающих влияние на процессы фотосинтеза, является температура. Известно, что у хвойных растений умеренной зоны фотосинтез наблюдается при температурах от –2 до –3 °С (по некоторым данным до –15 °С), достигая наибольшей интенсивности при 20–28 °С [3]. За период наблюдений перепад среднесуточных температур был весьма значительным: от +28 °С в июле 2007 г. до –28 °С в январе 2008 г. Понятно, что основное влияние температура оказывает на темновую фазу фотосинтеза, регулируя активность ферментов и скорость диффузии углекислого газа, значительно меньше влияя на световую фазу, поскольку поглощение света и миграция энергии практически не зависят от температуры [3, 5]. Тем не менее при описании спектров флуоресценции положение максимумов обычно указывается в контексте температуры. Следовательно, для упрощения в дальнейшем процедуры получения информации по спектрам флуоресценции, прежде всего, было необходимо разрешить вопрос о стабильности положения максимумов регистрируемого флуоресцентного отклика вне зависимости от температуры или воздействия других стрессовых факторов.

С этой целью проводилось сглаживание полученных спектров (представляющих собой массив из 2500 точек) FFT-фильтром по 50 точкам, определялись положение максимумов и интенсивность соответствующих сигналов флуоресценции. Было установлено, что максимум красной флуоресценции всех пригодных для обработки спектров расположен в спектральном диапазоне 686,5–691,5 нм (F_{689}), а максимум дальней красной флуоресценции – в диапазоне 730–740 нм (F_{735}). Затем интенсивность сигналов была рассчитана как среднее арифметическое массива данных установленных спектральных диапазонов. Корреляционный анализ интенсивностей сигналов флуоресценции, полученных разными методами, показал практически полное совпадение их значений (по критерию Стьюдента $R^2 = 0,999$).

Стабильное положение пиков флуоресценции позволило провести усреднение полученных результатов по декадам, что соответствует периоду колебаний синоптического масштаба [12]. Такое усреднение позволило выявить наиболее характерные изменения спектров флуоресценции в различ-

ные периоды жизненного цикла исследуемого растения.

Усредненные по 10 дням сглаженные FFT-фильтром с шириной окна 5 нм спектры флуоресценции за период с 01.07 по 21.12.2007 г. представлены на рис. 2, а. Для всех спектров характерно наличие максимума в области дальней красной флуоресценции. Для спектров, полученных за период с 1 июля по вторую декаду октября, в области красной флуоресценции проявляется максимум, более слабый по интенсивности. Очевидно, что в течение периода с 01.07 по первую декаду сентября наблюдается рост интенсивностей сигналов флуоресценции с последующей тенденцией к уменьшению. Важно отметить, что в октябре происходит не просто понижение уровня сигнала в максимумах: в последней декаде месяца максимум красной флуоресценции практически уже не проявляется. В первой декаде ноября максимум спектра флуоресценции в полосе 730–740 нм достигает своих минимальных за период наблюдений значений и по первую декаду апреля включительно не превышает установившегося уровня (рис. 2, а, 3).

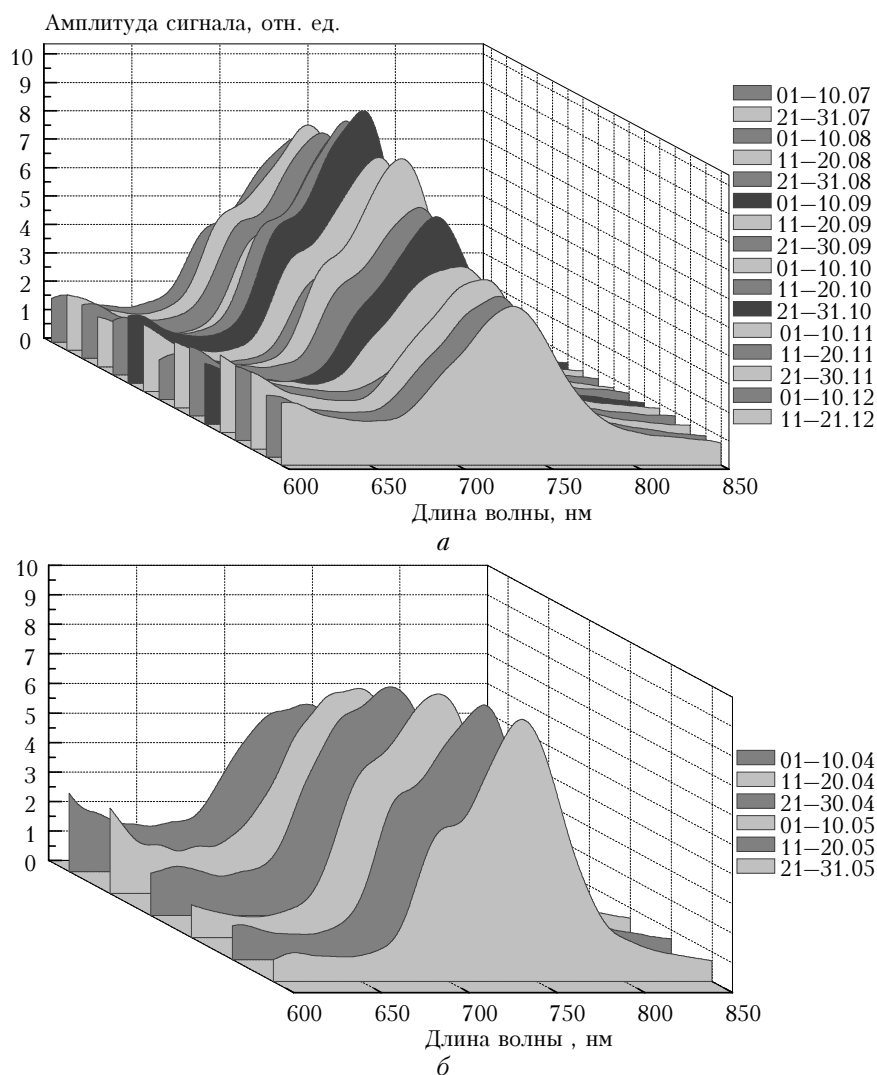


Рис. 2. Спектры флуоресценции, полученные в июле–декабре 2007 г. (а) и апреле–мае 2008 г. (б)

Одним из основных факторов, регламентирующих вегетационный период, является температура. В среднем в климатических условиях юга Западной Сибири период вегетации завершается к середине октября, поскольку фотосинтез у большинства хвойных растений умеренной зоны наблюдается до температур $-2...-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (у некоторых видов до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) [3]. В 2007 г. в Томске отрицательными среднесуточными температурами характеризуется период после 22 октября [13]. Следовательно, отсутствие максимума в полосе красной флуоресценции, зарегистрированное в третьей декаде октября, может служить признаком окончания периода вегетации.

В апреле–мае 2008 г. проявляется обратная тенденция (рис. 2, б, 3). С 20 апреля при достаточно резком потеплении и переходе минимальных суточных температур в область положительных значений [13] наблюдается постепенное формирование максимума дальней красной флуоресценции, а к концу первой декады мая окончательно формируется максимум в области красной флуоресценции. Отметим, что наряду с ростом интенсивности флуоресцентного сигнала на длине волны 735 нм к третьей декаде мая регистрируется спад интенсивности в полосе красной флуоресценции (см. рис. 3).

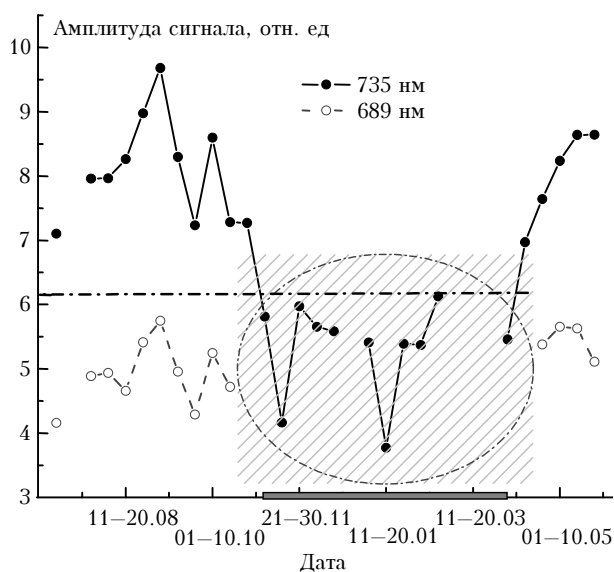


Рис. 3. Изменение интенсивности максимумов сигналов в диапазонах дальней красной F_{735} и красной F_{689} флуоресценции (выделен период, в котором максимум F_{689} не регистрируется)

Период начала вегетации в регионе юга Западной Сибири связывают с началом периода безморозных ночей, т.е. концом апреля — началом мая. В 2008 г. в Томске безморозный период установился в последней декаде апреля. Именно в этот период формируется характерный для хвойных спектр флуоресценции хлорофилла. Таким образом, полученные нами данные абсолютно отражают годовой цикл растения и позволяют достаточно точно определить временные границы вегетационного периода сосны.

При исследовании состояния фотосинтетического аппарата растений важной характеристикой является отношение интенсивностей максимумов дальней красной и красной флуоресценции (F_{735}/F_{689}). Отмечено, что для ИЛФ величина ОПФ зависит от температуры, при которой проводятся измерения, длины волны возбуждения, количества хлорофилла, индекса листовой поверхности, ориентации листа и фонового отражения [14, 15]. Однако вопрос относительно того, функциональность какой фотосистемы в большей степени она отражает, остается достаточно дискуссионным.

В период 1960–1980 гг. в ряде работ по исследованию флуоресцентных спектров была показана стабильность ФС I растений, в том числе высших, при вегетации в заданных экспериментальных условиях. Считалось, что способность к флуоресценции обладают в основном молекулы хлорофилла а ФС II. В этом случае отношение полос флуоресценции рассматривалось как нормированный сигнал, характеризующий количество хлорофилла. При этом была установлена линейная связь величины ОПФ и содержания хлорофилла [15].

В более поздних работах [6, 16, 17] приведены данные, которые доказывают лабильность ФС I в меняющихся условиях окружающей среды. Показано, что при комнатной температуре вклад ФС I в общий флуоресцентный сигнал составляет более 40%. По результатам измерений, проведенных при комнатной температуре, выявлена линейная связь величины ОПФ с концентрацией реакционных центров ФС I.

В данной статье такая сама по себе достаточно важная проблема не является предметом исследования. Существенно, что величина отношения полос флуоресценции является довольно информативной с точки зрения контроля над состоянием фотосинтетического аппарата растения.

В конкретном случае проведения эксперимента в натуральных условиях флуоресценция ОПФ из всех перечисленных выше факторов обусловлены преимущественно изменениями количества хлорофилла и температуры. Случайные флуоресценции позволила сгладить процедура усреднения полученных спектров. Местонахождение СЛС в экологически чистом районе Томска практически исключает влияние большинства антропогенных факторов на состояние фотосинтетического аппарата исследуемого объекта, создавая уникальную возможность изучения воздействия только природных факторов. Изменения отношения полос флуоресценции в течение вегетационного периода представлены на рис. 4, а.

Безусловно, отсутствие статистических данных не позволяет делать общих выводов. Однако для периода наблюдений можно отметить ряд особенностей вегетационного периода 2007 и начала вегетации 2008 г.

Значительные флуоресценции ОПФ характерны для летних месяцев (июль–август). Однако, начиная с последней декады августа по сентябрь включительно, величина отношения не претерпевает сколько-нибудь значимых изменений, что может

свидетельствовать о достаточно стабильном состоянии фотосинтетического аппарата растения в этот период. В целом временной интервал июль–сентябрь характеризуется незначительным положительным трендом. Резкий спад анализируемого параметра наблюдается ко второй декаде октября, т.е. к завершению вегетации.

Для начала периода вегетации характерен достаточно быстрый по декадам рост ОПФ, который идеально ($SD = 0$) аппроксимируется полиномиальным трендом третьего порядка (рис. 4, б), вид которого описывается уравнением

$$F_{735}/F_{689} = 0,006x^3 - 0,014x^2 - 0,037x + 1,393,$$

где x – порядковый номер декады за период 21.04–31.05.2008 г.

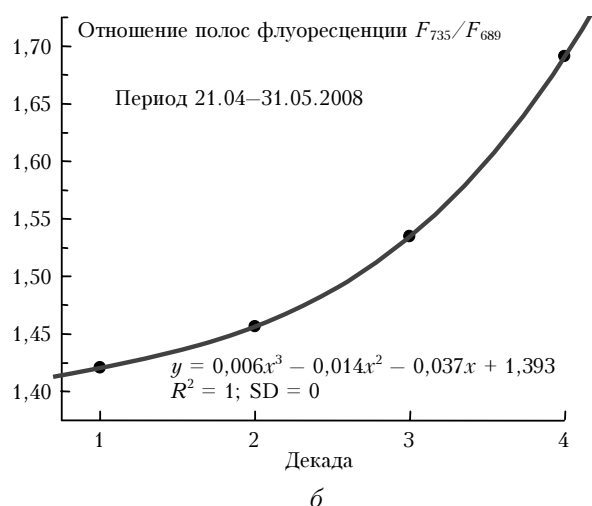
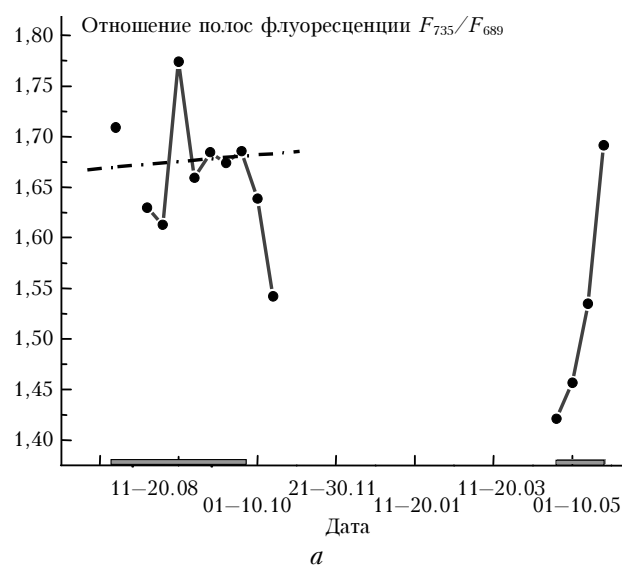


Рис. 4. Сезонные вариации отношения полос флуоресценции F_{735}/F_{689} . Выделены периоды 01.07–31.09.2007 со слабо положительным трендом (а) и 21.04–31.05.2008, характеризующиеся полиномиальным трендом третьего порядка (б)

Возможно, отсутствие выраженных флуктуаций связано с тем, что, несмотря на межсуточную

изменчивость температуры, в целом этот период характеризуется положительными минимальными температурами.

Заключение

В настоящее время комплекс Сибирской лидарной станции дополнен созданием флуоресцентного канала. Уникальность проводимых исследований заключается в возможности получения спектров флуоресценции методом индуцированной лазером флуоресценции взрослых древесных растений в природных условиях в режиме реального времени. Анализ спектров флуоресценции сосны (*Pinus silvestris*) обыкновенной, полученных в течение периода 01.07.2007–05.05.2008 гг., позволяет сделать ряд достаточно значимых выводов.

1. В течение вегетационного периода флуоресценция хлорофилла листового аппарата сосны, возбужденная лазерным излучением на длине волны 532 нм, характеризуется двухмодульной структурой. Один максимум находится в волновом диапазоне 686,5–691,5 нм (F_{689}), другой – 730–740 нм (F_{735}). Максимум дальней красной флуоресценции по интенсивности существенно превышает уровень сигнала в полосе красной флуоресценции.

2. Максимум красной флуоресценции не регистрируется в течение времени года, характеризующегося отрицательными температурами, начало и конец которого соответствуют началу и окончанию вегетационного периода.

3. В конкретных условиях проведения эксперимента флуктуации отношения интенсивностей максимумов дальней красной и красной флуоресценции (F_{735}/F_{689}) обусловлены преимущественно изменениями количества хлорофилла и температуры. Значительная изменчивость параметра характерна для летних месяцев 2007 г. (июль–август), а во второй декаде октября, к окончанию вегетационного периода, происходит его резкий спад. Для периода начала вегетации 2008 г. (третья декада апреля – май) очевиден достаточно быстрый монотонный рост отношения F_{735}/F_{689} по декадам, характеризующийся полиномиальным трендом третьего порядка. Отсутствие выраженных флуктуаций в значительной степени может быть обусловлено установившимся в течение этого времени периодом безморозных ночей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (контракт № 02.518.11.7088) и гранта РФФИ № 08.07.00558.

1. Кондратьев К.Я., Крапивин В.Ф. Моделирование глобального круговорота углерода. М.: Физматлит, 2004. 336 с.
2. Canadel I.G., Dickinson R., Hibbard K., et al. Global Carbon Project: The Science Framework and Implementation. Report № 1. Earth System Science Partnership. Canberra, 2003. 69 p.
3. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.: Высш. школа, 2005. 737 с.
4. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу: Учебн. пособие для студентов вузов / В.Ф. Гаври-

- ленко, Т.В. Жигалова; Под ред И.П. Ермакова. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 256 с.
5. Рубин А.Б. Первичные процессы фотосинтеза // Сорос. общобраз. ж. 1997. № 10. С. 22–27.
 6. Заворуева Е.Н. www.vak.ed.gov.ru; www.kgau.ru/science/zavoruева.doc
 7. Зуев В.В., Зуева Н.Е. Влияние вариаций суммарного озона на изменение уровня солнечной УФ-В-радиации // Оптика атмосф. и океана. 2006. Т. 19. № 12. С. 1053–1061.
 8. Зуев В.В., Бондаренко С.Л. Исследование озоносферы методами дендрохронологии. Томск: Изд-во ИОА СО РАН, 2007. 160 с.
 9. Усольцев В.А. Формирование банков данных о фитомассе лесов. Екатеринбург: УрО РАН, 1998. 540 с.
 10. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. 238 с.
 11. Chappelle E.W., Williams D.L. Laser-Induced Fluorescence from Plant Foliage // IEEE Trans. Geosci. and Remote. Sens. 1987. GE-25. N 6. P. 726–736.
 12. Зуев В.В. Дистанционный оптический контроль стратосферных изменений. Томск: МГП «РАСКО», 2000. 140 с.
 13. <http://meteo.infospace.ru>
 14. Заворуева Е.Н., Заворужев В.В. Корреляция концентрации реакционных центров первой фотосистемы с величиной отношения дальней красной к красной флуоресценции хлорофилла фототрофов // Оптика атмосф. и океана. 2008. Т. 21. № 7. С. 648–650.
 15. Rosema A., Snel J.F.H., Zahn H., Buurmeijer V.F., Van Hove I.W.A. The relationship between laser-induced chlorophyll fluorescence and photosynthesis // Remote Sens. of Environ. 1998. V. 65. P. 143–154.
 16. Заворуева Е.Н., Заворужев В.В. Концентрационные зависимости отношения красной и дальней красной флуоресценции хлорофилла высших растений // Оптика атмосф. и океана. 2004. Т. 17. № 1. С. 63–67.
 17. Заворуева Е.Н., Заворужев В.В. Флуоресцентный мониторинг фотосинтетического аппарата мелколиственных деревьев при антропогенном воздействии // Оптика атмосф. и океана. 2006. Т. 19. № 4. С. 319–321.

V.V. Zuev, N.E. Zueva, M.V. Grishaev. Seasonal variations of fluorescence of Scotch pine according to data of measurements at Siberian Lidar Station.

We present the fluorescence spectra of Scotch pine (*Pinus silvestris*) for period 01.07.2007–31.05.2008, obtained at the Siberian Lidar Station in real-time mode under field conditions by the method of laser-induced fluorescence. We present the block-diagram of lidar, allowing us to obtain the fluorescence spectra of adult wood plants. It is shown that, during the growing period, there are two maxima in the spectrum, one located in the region of far red fluorescence (F_{735}) and another (far less intense) in the region of red (F_{689}) fluorescence. It is found that the maximum in the band F_{689} is recorded only during the growing period. It is shown that the largest variations of the parameter F_{735}/F_{689} , characterizing the amount of chlorophyll, was observed during summer period, and the smallest variations in September 2007. For period of beginning of the growing season of 2008, quite rapid growth of the ratio F_{735}/F_{689} was recorded, with the absence of pronounced variations.