

Н.А. Воробьева**, **А.И. Гришин***, **А.П. Зотикова****, **Г.Г. Матвиенко***,
О.А. Романовский*, **О.В. Харченко***

Применение эффекта лазерно-индуцированной флуоресценции для дистанционного исследования фотосинтетического аппарата растений

**Институт оптики атмосферы СО РАН, г. Томск
**Томский филиал Института леса СО РАН*

Поступила в редакцию 23.03.2000 г.

Проведено сравнительное исследование содержания хлорофиллов у ряда древесных растений традиционными спектрофотометрическими и флуоресцентными лазерными методами. Проанализированы сезонные изменения сумм хлорофиллов в весенне-летний период у хвойных и лиственных древесных растений. Проведены наблюдения за изменениями в содержании хлорофилла в связи с увяданием хвои и листьев. Экспериментальные результаты, полученные при использовании спектрофотометрического и лидарного методов изучения хода сезонной динамики хлорофилла и разрушения пигментного комплекса в процессе увядания хвои и листьев древесных растений, оказались идентичными.

Лидарные методы зондирования, позволяющие проводить дистанционные бесконтактные измерения, в последнее время широко применяются в различных областях науки. Определенные возможности имеют лидары для определения физиологического состояния растений в естественных условиях [1]. Среди спектроскопических эффектов, привлекательных с точки зрения слежения за физиологическими функциями растений и пригодных для реализации в лидарных системах, следует выделить методы анализа флуоресценции растительных тканей [2–5]. Флуоресценция хлорофилла широко используется для анализа фотосинтетического аппарата растений.

Фотосинтетическая функция листа и его пигментный комплекс характеризуются высокой степенью изменчивости. Эти изменения связаны с закономерностями онтогенеза листа, древесного организма и влиянием экстремальных факторов среды, которые существенно изменяют величину и ритм ростовых процессов, интенсивность фотосинтеза и характеристики пигментной системы [6].

Пигментная система растений, в частности содержание хлорофилла, являясь критерием оценки состояния растительности, одновременно косвенно характеризует и состояние окружающей среды. Это свидетельствует о перспективности использования данного показателя в качестве маркерного. Однако современные методики биохимического определения количественного содержания хлорофилла довольно трудоемки и требуют значительных временных затрат. Кроме того, при определении содержания хлорофилла в различных растворителях нарушается нативная структура пигментного комплекса листа, что связано с трудностями интерпретации получаемых результатов. Все это говорит о необходимости разработки новых методов в исследованиях количест-

венного содержания пигментов и организации пигментной системы растений. В настоящее время начаты работы по привлечению флуоресцентных методов исследования, в частности с применением лазера.

Цель данной работы – сравнительное исследование содержания хлорофиллов у ряда древесных растений традиционными спектрофотометрическими и флуоресцентными лазерными методами, в частности:

1. Исследование сезонных изменений суммы хлорофиллов в весенне-летний период у хвойных и лиственных древесных растений;

2. Наблюдения за изменениями в содержании хлорофилла в связи с увяданием хвои и листьев.

Для эксперимента использовались ветки из средней части кроны, срезаемые с одних и тех же предварительно отобранных деревьев в период с мая по сентябрь. Объекты исследования: сосна, кедр, береза, осина. Для спектрофотометрического определения содержания хлорофилла навески листьев или хвои растирали в 100%-м этиловом спирте и центрифугировали в течение 20 мин при 8 000 об/мин. Содержание пигментов определяли с помощью «Specord-V-VIS» в спиртовой вытяжке с последующим расчетом по формулам [7]. В листьях и хвое этих же веток и в те же сроки определяли содержание пигментов дистанционным лазерным методом.

Результаты спектрофотометрического определения пигментов приведены в табл. 1 и 2. Из таблиц видно, что как содержание хлорофилла, так и его варьирование в течение исследованного периода у различных деревьев неодинаковы. Так, двухлетняя хвоя сосны и кедра характеризуется более постоянным содержанием хлорофилла по сравнению с листьями березы и осины (см. табл. 1). Аналогичные изменения обнаружены и при исследовании листового аппарата дистанционным лазерным методом.

Таблица 1

Сезонная динамика суммы хлорофиллов в листовом аппарате древесных растений, мг/г сырой массы

Дата сбора	Сосна (двухлетняя хвоя)	Кедр (двухлетняя хвоя)	Береза	Осина
20.04.99.	0,83 ± 0,03	–	–	–
14.05	0,97 ± 0,02	1,60 ± 0,02	1,14 ± 0,01	–
2.06	0,96 ± 0,05	1,29 ± 0,03	1,65 ± 0,02	2,51 ± 0,01
25.06	1,11 ± 0,04	1,62 ± 0,01	2,01 ± 0,02	2,76 ± 0,03
1.07	1,02 ± 0,02	1,71 ± 0,02	2,57 ± 0,01	2,53 ± 0,04
23.09	1,64 ± 0,03	1,60 ± 0,04	0,70 ± 0,08	1,25 ± 0,01

Таблица 2

Изменение содержания суммы хлорофиллов при увядании листьев и хвои древесных растений, мг/г сухой массы

Вариант	Даты взятия проб	Продолжительность опыта, дни	Сосна	Кедр	Береза	Осина
Контроль	14.05	–	2,06 ± 0,04	3,81 ± 0,04	3,8 ± 0,02	–
Опыт	2.06	19	1,07 ± 0,10	1,38 ± 0,02	1,36 ± 0,08	–
Контроль	2.06	–	2,04 ± 0,11	3,07 ± 0,07	5,50 ± 0,05	8,96 ± 0,03
Опыт	1.07	29	0,90 ± 0,12	1,30 ± 0,15	0,85 ± 0,08	0,97 ± 0,09

При увядании листового аппарата наблюдалось постепенное разрушение его пигментного комплекса. Наиболее устойчивым была пигментная система сосны, быстрее всего разрушались листья осины (см. табл. 2).

Наряду со спектрофотометрическими методами проводились натурные исследования растений на основе изучения индуцированной лазером флуоресценции. Ранее нами проводились измерения лазерно-индуцированной флуоресценции хлорофилла с помощью лидара, регистрирующего эхосигналы на двух длинах волн 532 и 685 нм [8, 9].

Данные измерения проводились на базе модернизированного лидара, регистрирующего излучение флуоресценции хлорофилла на трех длинах волн: 685, 740 и 532 нм. При этом применение 12-разрядного АЦП позволило существенно расширить динамический диапазон принимаемого сигнала и увеличить точность измерений.

На рис. 1 приведена функциональная схема лидарного зондирования флуоресценции растений с использованием трех длин волн зондирования.

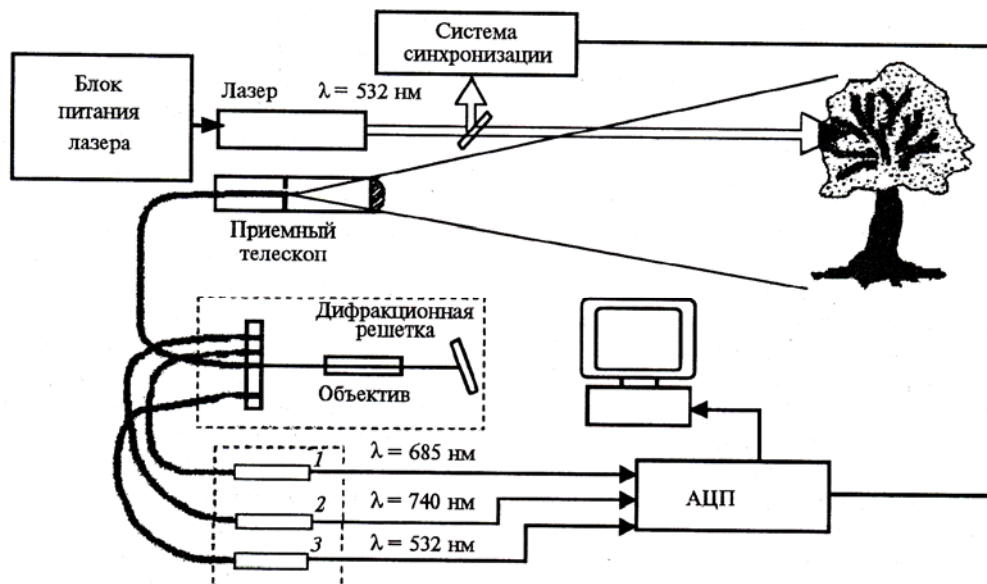


Рис. 1

Флуоресцентный лидар работает следующим образом. Лазер посылает импульс излучения на длине волны 532 нм в направлении зондируемого объекта. Под действием падающего света в стоксовой области спектра возбуждается излучение флуоресценции. Часть излучения улавливается с помощью приемного телескопа и по световоду направляется на вход спектрофотометра, собранного по автоколлимацион-

ной схеме. Измерение интенсивности излучения происходит на 3 длинах волн: 685, 740 и 532 нм. Первые две длины волн обусловлены флуоресценцией хлорофилла типа *a* и *b* соответственно. Третья длина волны необходима для нормировки принятого излучения флуоресценции. С выхода спектрофотометра излучение по световодам направляется на блок ФЭУ (1, 2, 3), использующихся в качестве фотодетекторов.

Далее 3 электрических сигнала направляются на входы АЦП, имеющих частоту дискретизации 40 МГц. АЦП запускается импульсом синхронизации, формируемой специальной системой одновременно с моментом излучения импульса. С выхода АЦП цифровая информация направляется в компьютер, где осуществляются предварительная обработка и запись накопленных сигналов.

Изменению подверглась и методика проведения лидарных измерений. В данном цикле проводилось зондирование тех же образцов растений, которые использовались в спектрофотометрических исследованиях. Образцы размещались в банках с водой на расстоянии 70 м от лазерного локатора и подвергались облучению в среднем 2 раза в неделю в темное время суток. При этом наблюдались изменения флуоресцентных характеристик хлорофилла от момента среза образцов до стадии, соответствующей полному увяданию растений. Всего было осуществлено 35 циклов измерений, при

этом смена образцов происходила 6 раз за период с 20 апреля по 23 сентября 1999 года.

Временной ход флуоресцентных характеристик для кедр, сосны, березы и осины в относительных единицах представлен на рис. 2 (а – длина волны 685 нм, б – 740 нм). Нулевая отметка соответствует 20 апреля 1999 года. Вертикальные линии показывают моменты замены образцов.

Анализ данных, приведенных на рис. 2, показывает, что интенсивность флуоресценции для длин волн 685 и 740 нм существенно различается, причем наибольшие отличия наблюдаются для осины. Отношение интенсивностей флуоресценции для нее колеблется в пределах 4–5. Наименьшие отношения характерны для хвойных пород, для которых эти величины варьируют в пределах 1,5–2. Эти измерения подтверждают ранее сделанный вывод, что наибольший выход флуоресценции в весенне-летний период имеют лиственные деревья.

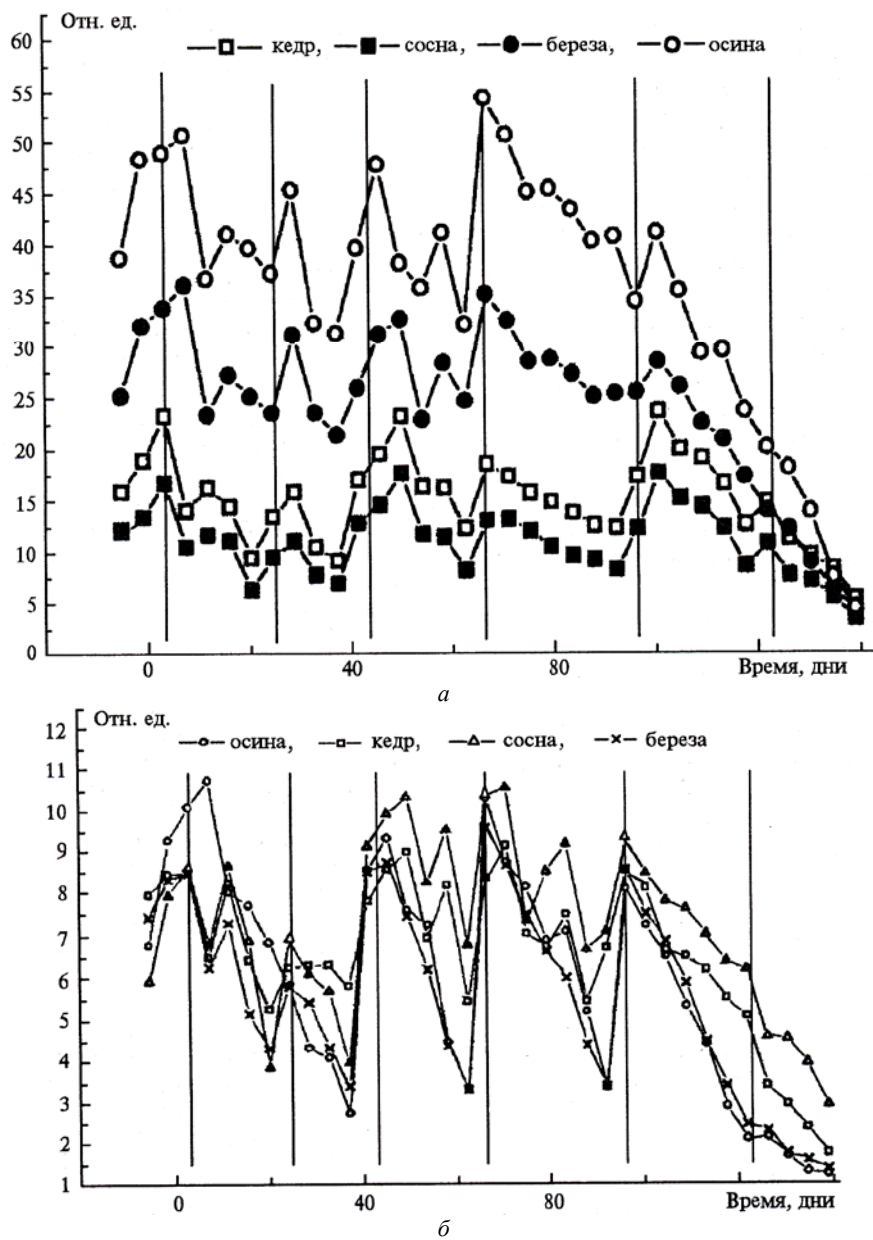


Рис. 2

Из рис. 2 также видно, что временной ход интенсивности флуоресценции подвержен циклическим изменениям, период которых совпадает с интервалами времени между сменой исследуемых образцов. Из графиков, приведенных на рис. 2, видно, что каждый из этих интервалов характеризуется падением значения уровня флуоресценции ко времени его окончания. Эта закономерность особенно четко наблюдается для лиственных пород дерева, причем она проявляется во всех интервалах времени для двух спектральных участков. В то же время следует отметить, что данные, относящиеся к зондированию растений на длине волны 740 нм, обладают значительно меньшим диапазоном изменчивости по сравнению с данными для длины волны 685 нм. При этом следует учесть, что результаты, полученные при зондировании на длине волны 740 нм, относятся к хлорофиллу типа *a*.

Сравнение результатов, полученных на основе прямых измерений содержания хлорофилла (спектрофотометрический метод), и лидарных измерений показывает, что между ними существует определенная взаимосвязь. Во всяком случае, диапазоны изменчивости содержания хлорофилла, по данным спектрофотометрических и лидарных измерений, совпадают. При этом следует отметить, что это совпадение относится ко всем типам деревьев, используемых в эксперименте.

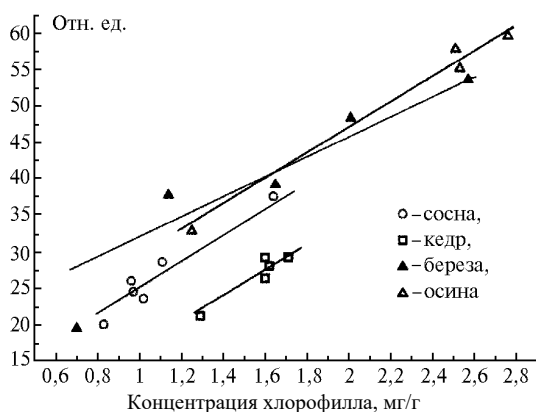


Рис. 3

На рис. 3 приведены калибровочные характеристики лидарной системы, связывающие суммарное содержание хлорофилла в растениях с флуоресцентными сигналами. В принципе эти данные позволяют осуществлять непосредственное измерение состояния растений на базе данного локатора. Однако при переходе к другой измерительной системе калибровку придется повторить. Поэтому в дальнейшей работе планируется установить взаимосвязь концентрации хлорофилла с квантовым выходом флуоресценции, что позволит поднять проводимые измерения на новый качественный уровень.

Таким образом, нами получены экспериментальные данные о сезонной динамике хлорофилла и разрушения пигментного комплекса в процессе увядания хвои и листьев древесных растений при использовании спектрофотометрического и лидарного методов.

Итоги проведенного анализа показали идентичность результатов, полученных принципиально различными методами.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 98-04-03068; 98-04-03099; 99-04-49085.

1. Лукин Ю.Л., Агишев В.С., Берников А.Д. и др. // Оптика атмосферы. 1989. Т. 2. № 5. С. 506–512.
2. Гаевский Н.А., Морзун В.Н. // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 1. С. 136–145.
3. Нестеренко Т.В., Сидько Ф.Я. // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 1. С. 10–15.
4. Кондратьев К.Я., Каневский В.И. Лазерное дистанционное зондирование растительности. Л.: Гидрометеоздат, 1987. 168 с.
5. Выгодская Н.Н., Горикова И.И. Теория и эксперимент в дистанционных исследованиях растительности. Л.: Гидрометеоздат, 1987. 178 с.
6. Мокроносов А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука, 1981. 335 с.
7. Шлык А.А. // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 91–154.
8. Гришин А.И., Матвиенко Г.Г., Харченко О.В., Тимофеев В.И. // Оптика атмосферы и океана. 1997. Т. 10. № 7. С. 475–478.
9. Гришин А.И., Матвиенко Г.Г., Харченко О.В. и др. // Оптика атмосферы и океана. 1999. Т. 12. № 4. С. 334 – 337.

N.A. Vorobyeva, A.I. Grishin, A.P. Zotikova, G.G. Matvienko, O.A. Romanovskii, O.V. Kharchenko. Application of laser-induced fluorescence effect to remote research of the photosynthetic apparatus of plants.

The comparative research of the chlorophyll contents for a number of arboreous plants by traditional spectrophotometric and fluorescent laser methods is carried out. The seasonal changes in the chlorophyll sums in the sprint-summer period at coniferous and deciduous arboreous plants are analysed. The changes in the chlorophyll contents in connection with needles and leaves withering are under observation. The experimental results are received by spectrophotometric and lidar methods on cholophyll seasonal dynamics and pigment complex destruction during needles and leaves withering. Our analysis has shown the results obtained by different methods to be identical.