

УДК 504.064.2+535.372

Лабораторные и лидарные измерения спектральных характеристик листьев березы в различные периоды вегетации

А.В. Афонасенко¹, А.Н. Иглакова¹, Г.Г. Матвиенко¹,
В.К. Ошлаков¹, В.Е. Прокопьев^{2*}

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

²Институт сильноточной электроники СО РАН
634055, г. Томск пр. Академический, 2/3

Поступила в редакцию 22.10.2011 г.

Приведены спектры поглощения излучения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции листьев и хвои растений, полученные в лабораторных и натурных экспериментах. Натурные спектры лазерно-индукционной флуоресценции и отражения получены в дневное и сумеречное время. Результаты экспериментов и численные оценки демонстрируют возможность проведения дистанционных исследований спектров флуоресценции растительного покрова относительно маломощными лидарными системами.

Ключевые слова: флуоресценция, поглощение, лазер, хлорофилл, береза; fluorescence, absorption, laser, chlorophyll, birch.

Введение

Оптические методы дистанционного зондирования широко применяются для решения самых разнообразных задач, в том числе и для оценки состояния растительного покрова (РП) [1, 2]. Наиболее известными оптическими методами контроля состояния РП являются: метод обратного рассеяния [3–5], метод комбинационного рассеяния [6–8], флуоресцентный метод [9–12]. Воздействие различных природных факторов (зачастую комплексное) приводит к возникновению физиологических и морфологических изменений как у отдельно взятого растения (микроуровень), так и у растительно-го сообщества в целом (макроуровень). Такая реакция всегда находит свое отражение в изменении спектральной характеристики растительности и становится особенно очевидной, если растения переведены в стрессовое состояние [13, 14].

Наиболее чувствительным способом определения состояния зеленого листа является измерение спектров флуоресценции, так как в этих спектрах в отличие от спектров поглощения (отражения) содержится информация о состоянии пигментной (светособирающей) и реакционной части фотосинтезирующего аппарата. Ранее данный метод анализа применялся только в лабораторных условиях [15].

в дистанционных методах использовали отношение максимумов интенсивностей длинноволнового (735–740 нм) и коротковолнового (685 нм) излучения в полосе флуоресценции [16], наличие которых обусловлено различием в спектральных свойствах фотосистем I и II растений. В связи с развитием высокочувствительных многоканальных спектральных приборов и вычислительной техники появилась возможность не только лабораторных, но и лидарных исследований спектров флуоресценции РП методом лазерно-индукционной флуоресценции (ЛИФ) [17]. Следует отметить, что изменения параметров спектральных характеристик РП, вызванные различными стрессовыми факторами (недостатком или избытком элементов питания, загрязнением почвы токсикантами, водным дефицитом или заболеванием растений), зачастую имеют сходный характер. Как правило, в одном и том же спектральном интервале наблюдаются сигналы флуоресценции от различных биохимических составляющих природных объектов.

Общая цель нашей работы – получение «базовых» спектральных характеристик для решения задач классификации сигналов в натурных экспериментах. В настоящей статье приведены результаты лабораторных и натурных лидарных исследований спектральных характеристик (спектры поглощения, отражения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции, лазерно-индукцируемой флуоресценции) листьев нормально функционирующего растения в различные вегетационные периоды (осень 2010, весна–лето–осень 2011 г.) и в различное время суток. План эксперимента включал лабораторные исследования спектров поглощения, пропускания,

* Анна Владимировна Афонасенко (aav@iao.ru); Анастасия Николаевна Иглакова (ian@iao.ru); Геннадий Григорьевич Матвиенко (mgg@iao.ru); Виктор Константинович Ошлаков (ovk@iao.ru); Владимир Егорович Прокопьев (prokop@ogl.hcei.tsc.ru).

возбуждения флуоресценции и флуоресценции листьев березы *Betula pendula/Betula verrucosa* (береза повислая или бородавчатая), комнатного растения *Peperomia obtusifolia*, хвои сосны в различные вегетационные периоды. При проведении натурных (лидарных) экспериментов ставилась задача использования «лабораторных» спектральных характеристик при интерпретации результатов зондирования.

В экспериментах использовались традиционные схемы оптических приемопередающих систем, позволяющие регистрировать в режиме лидарного зондирования оптические сигналы в направлении 180° (направление к источнику излучения), в лабораторных условиях — сигналы от объекта исследования под угловыми направлениями 0, 45, 135, 180°. В отдельных случаях регистрировались сигналы от поперечного среза толщи листа (комнатное растение) в угловом направлении 90°.

Лабораторные эксперименты проводились с использованием стандартной аппаратуры по традиционным методикам [18]. В частности, измерение спектров возбуждения флуоресценции проводилось с помощью спектрофлуориметра Hitachi-850, спектров поглощения и флуоресценции с помощью флуоресцентного микроскопа ЛЮМАМ-З. Отличительной особенностью являлось использование в качестве источника излучения нескольких типов излучателей: CW-лазера [PGL-III-(С)-532 200 мВт], генерирующего излучение на длине волны 0,532 мкм, мощностью 150–200 мВт, ртутной лампы НВО-100W/2, ксеноновой лампы Osram XBO 150W/1; галогеновой лампы. При работе с лампами из спектра излучения выделялась светофильтром С3С-24 часть спектра, соответствующая спектру поглощения хлорофилла. В отдельных случаях использовались светофильтры КС-10, КС-17 для выделения спектрального диапазона флуоресцентного сигнала. Регистрация обратнорассеянных сигналов, сигналов отражения и флуоресценции осуществлялась с помощью спектрометра высокого разрешения HR4000 (Ocean Optics) — спектральный диапазон 195–1100 мкм, схема Черни–Тёрнера, дифракционная решетка 300 штр./мм, входная щель 25 мкм, ввод анализируемого излучения с помощью световода.

В натурных исследованиях использовалась традиционная схема лидарного зондирования. Для возбуждения флуоресценции использовался лазерный источник мощностью 150–350 мВт, работающий на длине волны излучения 532 нм. Дистанция до объекта 50'100 м. В состав лидара входил телескоп, собранный по схеме Ньютона, диаметр параболического зеркала 300 мм, фокусное расстояние 800 мм. В лидарном эксперименте изображение пятна рассеяния фокусировалось на входном торце световода диаметром 1 мм, соединенного с входом в спектрометр HR4000.

Лабораторные исследования

В лабораторных экспериментах регистрировались спектры диффузного отражения, спектры пропускания и поглощения. В последнем случае

входной торец световода, соединенного со входом спектрометра, устанавливался вплотную к поверхности листа для уменьшения влияния эффектов рассеяния излучения в среде (рис. 1).

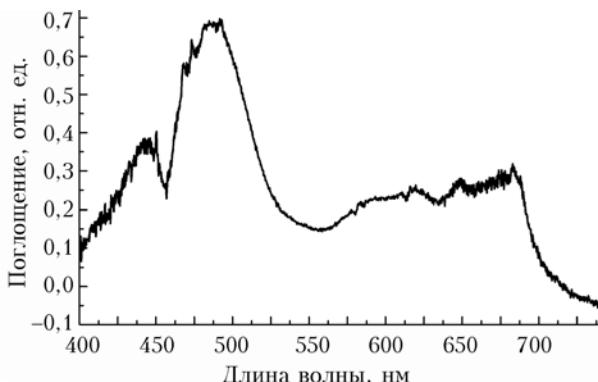


Рис. 1. Спектр поглощения зеленого листа березы

Видно, что основные максимумы полос поглощения приходятся на 440 и 680 (хлорофилл *a*) и 480 и 650 нм (хлорофилл *b*), относительные минимумы спектра поглощения листа — на длины волн 450–460 и 620–640 нм с абсолютным минимумом поглощения в области 550 нм. Измеренный нами спектр поглощения практически во всех деталях совпадает со спектрами поглощения, известными из [18]. Интересной особенностью этого спектра на длинах волн больше 720 нм является область «отрицательного» поглощения, которая, по всей видимости, обусловлена дополнительным вкладом флуоресценции листа в интенсивность прошедшего света. Этот факт указывает на незначительное погложение тканями растения в области длин волн больших 720 нм.

На рис. 2 показаны нормированные по локальным максимумам спектры поглощения (1) и спектры возбуждения флуоресценции (2, 3) на длине волны $\lambda_{\phi} = 740$ нм для зеленого листа в период максимума вегетационного периода и для засушенного (зеленого) листа березы.

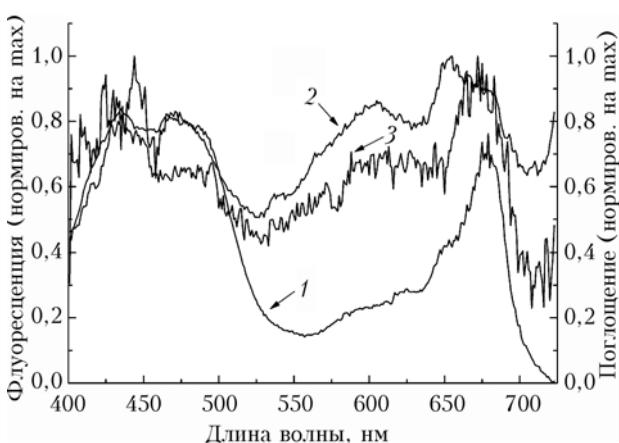


Рис. 2. Спектр поглощения (1) и спектры возбуждения флуоресценции листьев березы: зеленого (2) и засушенного зеленого (3)

Видно, что для сухого зеленого листа на длинах волн более 700 нм интенсивность спектра возбуждения близка к нулю, в то время как для нормального листа в этой области интенсивность спектра возбуждения является значительной (ненулевой). Изменения спектров поглощения и возбуждения флуоресценции листьев березы на длине волны максимума флуоресценции фотосистемы I имеют нетривиальный вид в области 680–720 нм и состоят, по крайней мере, из двух экспонент с характерным изменением на длине волны 700 нм. Интересно заметить, что локальный максимум спектра возбуждения на длине волны 716 нм совпадает с одной из

составляющих спектра молекулы воды. При этом в спектре поглощения нормального (живого) зеленого листа березы (кривая 1) на этих длинах волн также наблюдается незначительное (ненулевое) поглощение.

Проведены также измерения спектров флуоресценции от облучаемой поверхности (в направлении 135° или 180°) и спектров флуоресценции с противоположной (неосвещенной) стороны листа под углами 0 и 45° (рис. 3). Направление 0° совпадает с направлением воздействующего излучения. В отдельных случаях регистрировалось излучение флуоресценции в красной области под углом 90° от поперечного среза листа.

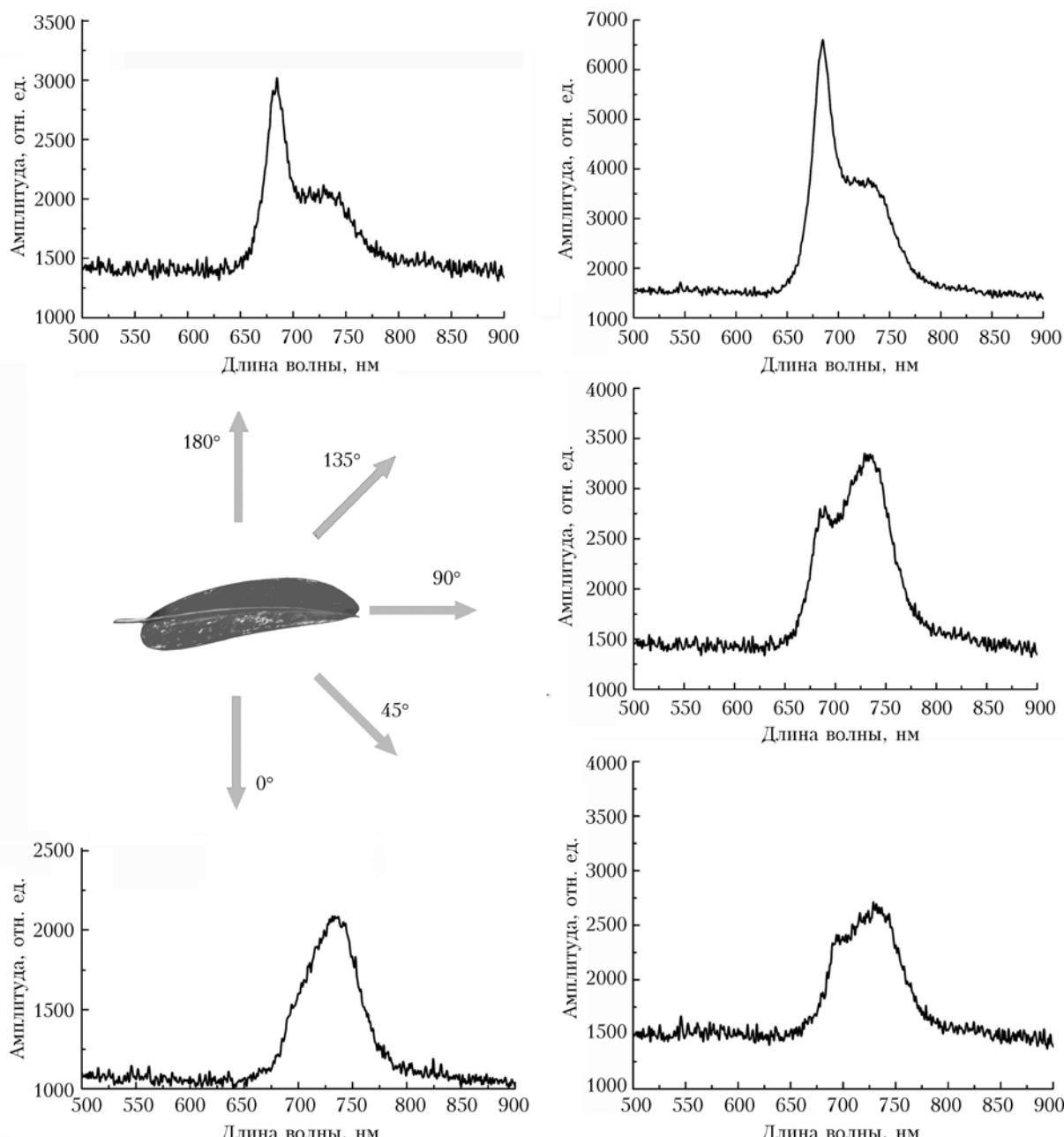


Рис. 3. Спектры флуоресценции листа комнатного растения в различных угловых направлениях в вертикальной плоскости по отношению к направлению облучения (за горизонтальную плоскость принята облучаемая поверхность листа)

Вид спектра (см. рис. 3) в области 650–800 нм в целом и интенсивность флуоресценции на длинах волн $\lambda_1 = 685$ и $\lambda_2 = 740$ нм в частности зависят от направления наблюдения и от взаимного расположения объекта наблюдения и приемника излучения (наблюдателя) относительно направления вызывающего флуоресценцию излучения. Здесь возможна следующая интерпретация. В работе [19], использующей новую концепцию оптической модели растительного покрова, лист моделируется не как отдельный рассеивающий элемент, а как локальный объем мультифазной среды со сложной полидисперсной структурой, перераспределение в спектре ЛИФ, подобно представленному на рис. 3, связывается с реабсорбцией излучения. Речь идет о явлении реабсорбции ЛИФ, неизбежно возникающей в плотных дисперсных средах, содержащих два и более флуорофоров. Практическое приложение связано с актуальной задачей лидарного мониторинга состояния растительного покрова, в первую очередь концентрации хлорофилла, регулирующего жизнедеятельность растений.

В лабораторных исследованиях использовался режим записи отдельных спектров и последовательности спектров с временным шагом между отдельными спектрами.

Известно, что существует временная реакция листа растения на стрессовое, превосходящее некоторый порог по интенсивности, излучение (эффект Каутского, индукция флуоресценции хлорофилла) [20]. На рис. 4, *a* представлены временные изменения спектров флуоресценции листа комнатного растения *Peperomia obtusifolia* в процессе длительного интенсивного облучения.

Временная зависимость сохраняется и в рядах отношения амплитуд на длинах волн 685 и 740 нм (рис. 4, *b*), которое является индикатором фотосинтезирующей активности листа. При этом в направлениях наблюдения над облучаемой адаксиальной стороной листа и частично от боковой поверхности (среза) это отношение больше единицы, а при наблюдении прошедшего слой листа излучения значение этого отношения меньше единицы. (Адаксиальная (лат. *ad «к» + axis «ось»*) – верхняя или отвернутая от стебля сторона листа растения [21].)

Для двух рядов наблюдений (в направлении 0 и 180°), полученных при освещении адаксиальной стороны листа, приведены значения вычисленных коэффициентов Спирмена τ_S , характеризующих тенденцию к линейному тренду, значения математического ожидания этих коэффициентов $M[\tau]$ и их среднеквадратических отклонений σ_τ для случайного ряда. Коэффициент Спирмена – критерий случайности, основанный на ранговой корреляции. Его асимптотическая относительная эффективность относительно регрессионной оценки равна 0,98 [22]. Для этих рядов тренды имеют разнонаправленный характер. Кривые 2 и 6 на рис. 4, *b* демонстрируют реакцию адаксиальной и абаксиальной сторон листа при *прямом* воздействии на них стрессового интен-

сивного излучения. Регистрация – под углом 135° (см. рис. 3). Известно, что адаксиальная сторона листа (рис. 4, *b* кривая 2), как правило, имеет защиту от стрессового (интенсивного) излучения, а абаксиальная сторона (кривая 6) лишена этой защиты. Восстановление исходного уровня интенсивности флуоресценции после прекращения облучения листа происходит в течение 5–10 мин.

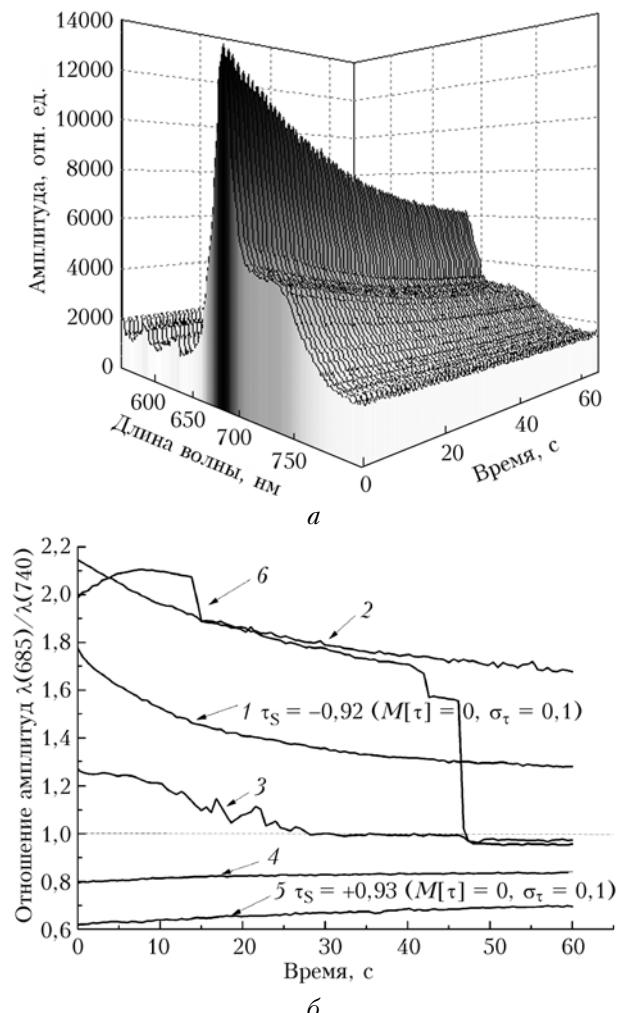


Рис. 4. Временные изменения спектров флуоресценции зеленого листа (*a*) и отношений их амплитуд на длинах волн 685 и 740 нм (*b*): 1 – 180°; 2 – 135°; 3 – 90°; 4 – 45°; 5 – 0 (адаксиальная сторона листа); 6 – 135° (абаксиальная сторона листа)

На рис. 5 приведены спектры ЛИФ (направление наблюдения 180°), полученные в лабораторном эксперименте от адаксиальной и абаксиальной сторон бересклетового листа в летний сезон наблюдений при сравнимых интенсивностях лазерного излучения ($\lambda = 532$ нм).

Как можно было предположить, исходя из различий морфологического строения и функциональных особенностей сторон, интенсивность и вид спектров флуоресценции этих поверхностей значительно отличаются.

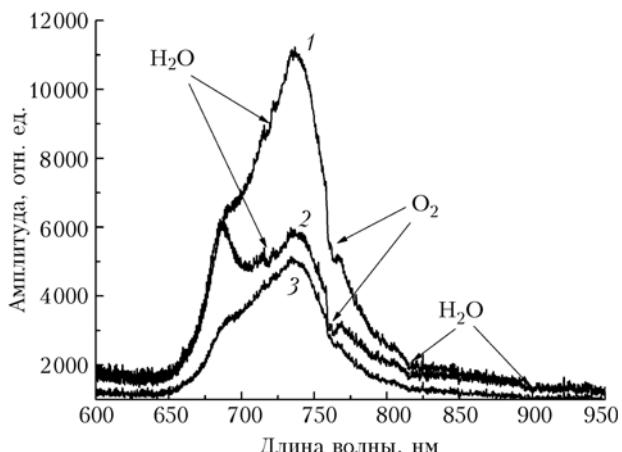


Рис. 5. Спектры ЛИФ адаксиальной (1, 3) и абаксиальной (2) сторон листа березы

На рис. 6 показаны лабораторные спектры ЛИФ листьев березы в начальный период вегетации (25 апреля 2011 г., преобладание пыльцы).

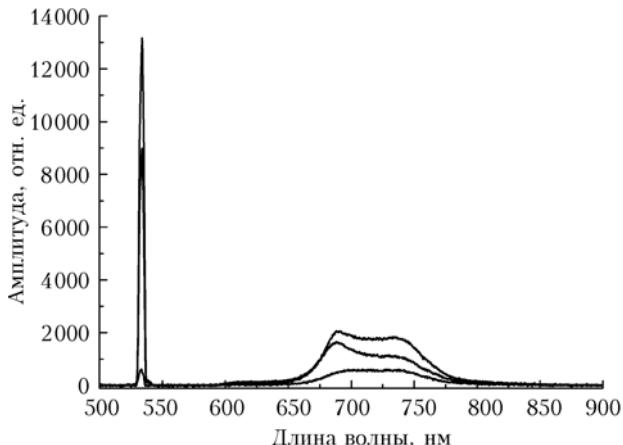


Рис. 6. Измеренные в лабораторных условиях спектры ЛИФ листьев березы в начальный период вегетации

Результаты представлены в «чистом виде», без использования красного светофильтра, подавляющего излучение лазера (532 нм).

Натурные лидарные исследования

В натурных лидарных исследованиях использовалась моностатическая схема лидарного зондирования. Система настраивалась таким образом, что поверхность, с которой регистрировался лидарный сигнал, полностью находилась внутри поверхности, освещенной возбуждающим флуоресценцию излучением.

С учетом небольшой мощности лазерного источника (150–200 мВт) в качестве объекта наблюдения было выбрано дерево, отстоящее от передающей системы на расстоянии 40 м. Система наведения позволяла наводить лидар и на затененную, и на освещенную солнечными лучами части кроны, а также производить зондирование над кроной и в участках кроны, свободных от листьев. При регистрации спектров использовалась возможность

предварительной записи в память спектрометра «фонового» спектра — до включения источника возбуждения флуоресценции. Фоновым, как правило, являлся спектр рассеянного солнечного излучения, отраженного от кроны дерева. Затем, после включения лазера, из суммарного спектра вычитался фоновый, полученный разностный спектр рассматривался как спектр флуоресценции. Применение светофильтров облегчало выбор способа визуализации зарегистрированных спектров.

Типичные спектры рассеянной солнечной радиации и спектры отражения кроны березы в различные сезоны, полученные на нашей установке в натурных измерениях (пассивный режим), показаны на рис. 7.

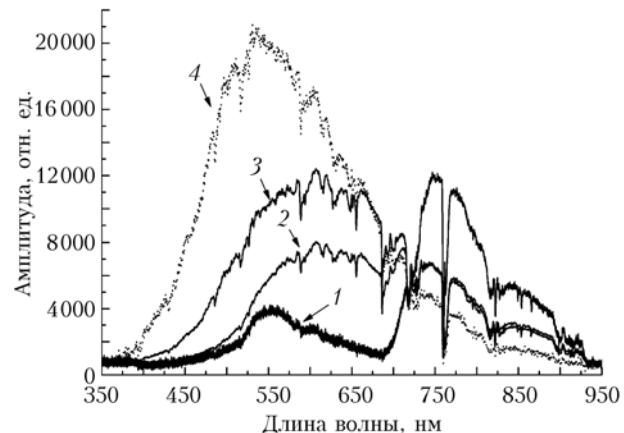


Рис. 7. Фоновые спектры солнечного излучения, рассеянного в сторону наблюдателя (4) и отраженного от кроны березы: 1 — зеленые листья; 2 — желто-зеленые листья; 3 — желтые листья

Видно, что наиболее значительная разница в спектрах отражения листьев березы и рассеянного солнечного излучения в области 400–700 нм, как и следовало ожидать, достигает максимального значения в летний вегетационный период.

На рис. 8 приведены две спектрограммы, выбранные из временной последовательности регистрации ЛИФ от кроны дерева.

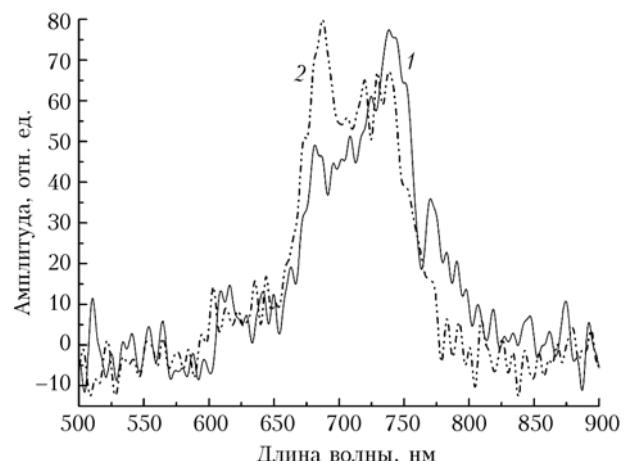


Рис. 8. Лидарные спектры ЛИФ листьев березы, полученные при облучении адаксиальной (1) и абаксиальной (2) сторон листа

С учетом результатов лабораторных исследований (см. рис. 5) эти спектры проинтерпретированы как спектры ЛИФ, полученные с адаксиальной и абаксиальной сторон листьев кроны бересклета в результате колебания листа под влиянием ветра.

На рис. 9 представлены измеренные спектры ЛИФ в период начала активной вегетации (5–7 мая 2011 г.) при солнечном освещении. В этом случае использовался красный светофильтр КС-17.

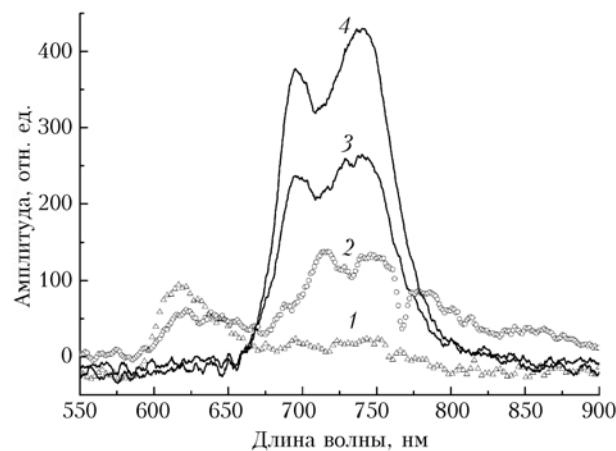


Рис. 9. Лидарные спектры ЛИФ бересклета (кривая 1 – ствол; 2, 3 – кроны) и кроны сосны (4)

В процессе измерений в поле зрения системы попадало различное количество листьев, ветки, возможно, часть ствола (кора). Кривая 3 дает представление о вкладе веток дерева (спектральный диапазон 600–650 нм) в наблюдаемые спектры флуоресценции, который можно заметить на кривой 2 рис. 8.

Заключение

Проведены параллельные лабораторные и натурные измерения спектров флуоресценции листьев бересклета. В качестве источников возбуждения флуоресценции использовались как лазер, так и традиционные спектроскопические источники – ртутные, ртутьно-ксеноновые лампы. Регистрация спектров флуоресценции осуществлялась в широком спектральном диапазоне с помощью многоканального быстродействующего высокочувствительного спектрометра HR4000 со спектральным разрешением 0,3–0,5 нм.

В лабораторных условиях измерены спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции листьев бересклета в различные вегетационные периоды. Максимальные значения поглощения и возбуждения флуоресценции в длинноволновом крыле спектров наблюдаются в период активного (максимальные значения индекса) вегетационного периода (май–июнь–июль).

Показано, что изменения спектров поглощения и возбуждения флуоресценции листьев бересклета на длине волны максимума флуоресценции фотосистемы I имеют нетривиальный вид в области

680–720 нм и состоят, по крайней мере, из двух экспонент с характерным изменением на длине волны 700 нм.

В лабораторных экспериментах зарегистрирован факт стрессового воздействия инициирующего флуоресценцию излучения на фотосистему листа. Следует отметить, что в этом случае интенсивность воздействующего излучения в лабораторных условиях примерно того же порядка, что в лидарных наносекундных системах. Время воздействия лазерного импульса (коллимированное излучение), как правило, длится единицы–десятка наносекунд с частотой от единиц до тысячи Гц, а в лаборатории мы использовали фокусированное излучение непрерывного источника. Тем не менее есть предпосылки для учета стрессового воздействия инициирующего флуоресценцию излучения в лидарных наблюдениях ЛИФ.

В натурном эксперименте измерены спектры флуоресценции (в области 600–800 нм), инициированные непрерывным лазерным излучением ($\lambda = 532$ нм) небольшой мощности. Анализ временных последовательностей спектров флуоресценции показал, что при лидарных наблюдениях ЛИФ значение отношения сигналов на длинах волн 685 и 740 нм будет зависеть не только от вегетационного периода (сезонные изменения), но и, во-первых, от метеоусловий (ветер, влажность, облачность) и положения Солнца в каждой серии наблюдений, во-вторых – от соотношения направления наблюдения и направления зондирования. В последовательности спектров флуоресценции, полученных от объекта, удаленного на 40 м от излучателя, зарегистрированы сигналы, принципиально отличающиеся значениями отношения амплитуд на длинах волн 685 и 740 нм. Результаты лабораторных исследований показали, что это, скорее всего, спектры от разных сторон листа (результат колебания листа под влиянием ветра).

Становится очевидным, что при интерпретации результатов наблюдений ЛИФ природных объектов необходимо осуществлять распознавание сигналов от адаксиальной и абаксиальной, от освещенной и теневой сторон листа. Наблюдаемые спектры ЛИФ в обычном состоянии зеленого листа являются суммарным спектром нескольких классов сигналов, аддитивные составляющие которого существенно отличаются по основному классификационному признаку – отношению интенсивностей в области длин волн 685 и 740 нм.

При разработке методики интерпретации экспериментальных данных о лазерно-индуцированной флуоресценции необходимо проводить лабораторные эксперименты с выбранным информационным признаком параллельно с натурными.

1. Чандра А.М., Гош С.К. Дистанционное зондирование и географические информационные системы. М.: Техносфера, 2008. 328 с.
2. Рис У.Г. Основы дистанционного зондирования. М.: Техносфера, 2006. 336 с.

3. Марчук Г.И., Кондратьев К.Я., Козодоров В.В. Радиационный баланс Земли: ключевые аспекты. М.: Наука, 1988. 224 с.
4. Кондратьев К.Я., Дьяченко Л.Н., Козодоров В.В. Радиационный баланс Земли. Л.: Гидрометеоиздат, 1988. 352 с.
5. Кондратьев К.Я., Козодоров В.В., Федченко П.П. Аэрокосмические исследования почв и растительности. Л.: Гидрометеоиздат, 1986. 231 с.
6. Клышико Д.Н., Фадеев В.В. Дистанционное определение концентрации примесей в воде методом лазерной спектроскопии с калибровкой по комбинированному рассеянию // Докл. АН СССР. 1978. Т. 238, № 2. С. 320–323.
7. Фадеев В.В. Лазеры в океанологии // Природа. 1978. № 9. С. 54–59.
8. Фадеев В.В. Дистанционное лазерное зондирование фотосинтезирующих организмов // Квант. электрон. 1978. Т. 5, № 10. С. 2221–2226.
9. Matvienko G.G., Timofeev V.I., Grishin A.I., Fateyeva N.L. Lidar fluorescent method for remote monitoring of the effects on the vegetation // Proc. SPIE. 2006. V. 6367. 63670F. 9 р.
10. Фатеева Н.Л. Дистанционная диагностика состояния растений на основе метода лазерно-индущированной флуоресценции: Автореф. дис. ... к.ф.-м.н. Томск: ИОА СО РАН, 2007. 123 с.
11. Маслов Д.В., Фадеев В.В., Литвинов П.Н. Трехпараметрическая модель формирования флуоресцентного отклика фотосинтезирующих организмов при импульсном лазерном возбуждении // Вестн. МГУ. Сер. 3. 2002. № 1. С. 34–37.
12. Мерзляков М.Н. Пигменты, оптика листа и состояние растений // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 4. С. 19–24.
13. Захаров В.П., Макурина О.Н., Тимченко Е.В., Тимченко П.Е., Котова С.П., Валиуллов Р.В. Экологический мониторинг городских территорий с помощью метода дифференциального обратного рассеяния // Вестн. Самар. гос. аэрокосмического ун-та. 2008. № 2(15). С. 261–271.
14. Тимченко Е.В. Дифференциальные оптические методы контроля состояния растений: Автореф. дис. ... к.ф.-м.н. Самара: СГАУ, 2009. 117 с.
15. Тимирязев К.А. Избранные сочинения в 4 томах. Солнце, жизнь и хлорофилл: Публичные лекции, речи и научные исследования. М.: ОГИЗ—СЕЛЬХОЗГИЗ, 1948. 2792 с.
16. Карнаухов В.Н. Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды / Под ред. А.Ю. Буданцева. М.: Наука, 2001. 186 с.
17. Бункин А.Ф., Власов Д.В., Микрамилов Д.М. Физические основы лазерного зондирования поверхности Земли. Ташкент: ФАН, 1987. 272 с.
18. Шмидт В. Оптическая спектроскопия (для химиков и биологов) / Под ред. С.В. Савилова. М.: Техносфера, 2007. 368 с.
19. Креков Г.М., Крекова М.М., Лисенко А.А., Матвиенко Г.Г. Статистическое моделирование трансспектральных процессов: реабсорбция ЛИФ // Оптика атмосф. и океана. 2008. Т. 21, № 12. С. 1076–1082.
20. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев: Альтерпрес, 2002. 188 с.
21. Большой словарь иностранных слов / Сост. А.Ю. Москвин. М.: ЗАО «Центрполиграф», 2005. 816 с.
22. Кендалл М., Стьюарт А. Многомерный статистический анализ и временные ряды. М.: Наука, Гл. ред. физ.-мат. лит., 1976. 736 с.

A.V. Afonasenko, A.N. Iglakova, G.G. Matvienko, V.K. Oshlakov, V.E. Prokopyev. Laboratory and lidar measurements of birch leaves spectral characteristics in different periods of vegetation.

This paper presents the laboratory and full-scale spectra of absorption, fluorescence and fluorescence excitation of plant leaves and needles. The spectra of laser-induced fluorescence and reflection were obtained in the daytime and twilight hours in the field conditions. The results obtained and numerical estimates demonstrate the possibility of remote sensing studies of fluorescence spectra of vegetation relative to low-power lidar systems.