

## Выбор спектральных диапазонов для лазерного флуоресцентного метода обнаружения стрессовых состояний растений

Ю.В. Федотов, О.А. Булло, М.Л. Белов, В.А. Городничев\*

Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,  
НИИ радиоэлектроники и лазерной техники  
107005, г. Москва, 2-я Бауманская, 5

Поступила в редакцию 5.12.2016 г.

Рассмотрен лазерный флуоресцентный метод обнаружения стрессовых состояний растений. Для длины волны возбуждения флуоресценции 532 нм приведены результаты обработки экспериментальных спектров флуоресценции растений в нормальном и стрессовых состояниях, вызванных различными факторами. Проведен сравнительный анализ вариантов спектральных диапазонов регистрации флуоресцентного излучения растений. Показано, что для задачи мониторинга растительности наилучшими с точки зрения надежности обнаружения стрессовых состояний растений являются спектральные диапазоны с центральными длинами волн 685 и 740 нм.

*Ключевые слова:* лазерный флуоресцентный метод, обнаружение стрессовых состояний растений, спектральные диапазоны; laser fluorescence method, detection of plant stress, spectral bands.

### Введение

В настоящее время перспективная область использования дистанционных лазерных методов — это контроль состояния растительности на основе лазерно-индуцированной флуоресценции (см., например, [1–18]).

Болезни растений, наличие загрязнителей в грунте, недостаток воды, питательных веществ и тому подобное приводят к стрессовым состояниям растений. Эффективные методы обнаружения таких состояний основаны на регистрации лазерной индуцированной флуоресценции растений.

Для дистанционных оперативных измерений подходит лазерный флуориметр, регистрирующий флуоресцентное излучение всего в двух узких спектральных диапазонах; в качестве информационного параметра используется отношение интенсивностей флуоресценции в них.

Однако неясным остается вопрос о выборе наиболее эффективных (для задачи обнаружения стрессовых состояний растений) пар спектральных диапазонов, в которых будет проводиться регистрация флуоресцентного излучения.

В различных экспериментальных работах используются спектральные диапазоны шириной 5–20 нм около двух центральных длин волн  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$

( $\lambda_1$  — в области 675–690 нм,  $\lambda_2$  — в области 730–740 нм). В качестве информационного признака для обнаружения стрессовых состояний используется отношение  $R = \frac{I(\lambda_1)}{I(\lambda_2)}$  интенсивностей флуоресценции, регистрируемых в данных спектральных диапазонах:

$$R_{675/730} = \frac{I(675)}{I(730)} \quad [20], \quad R_{680/730} = \frac{I(680)}{I(730)} \quad [17],$$

$$R_{685/730} = \frac{I(685)}{I(730)} \quad [9], \quad R_{685/735} = \frac{I(685)}{I(735)} \quad [5],$$

$$R_{690/735} = \frac{I(690)}{I(735)} \quad [19], \quad R_{680/740} = \frac{I(680)}{I(740)} \quad [15],$$

$$R_{685/740} = \frac{I(685)}{I(740)} \quad [13], \quad R_{690/740} = \frac{I(690)}{I(740)} \quad [18].$$

Используется также и регистрация флуоресцентного излучения при гораздо большей ширине спектральных диапазонов:

$$R_{680-712/712-750} = \frac{\int_{680 \text{ нм}}^{712 \text{ нм}} I(\lambda) d\lambda}{\int_{712 \text{ нм}}^{750 \text{ нм}} I(\lambda) d\lambda} \quad [16].$$

Цель нашей работы — определение (на основе экспериментальных измерений спектров флуорес-

\* Юрий Викторович Федотов (fed@bmstu.ru); Ольга Алексеевна Булло (ekomonit@bmstu.ru); Михаил Леонидович Белов (belov@bmstu.ru); Виктор Александрович Городничев (gorod@bmstu.ru).

ценции растений в нормальном и стрессовом состояниях) наиболее эффективной пары спектральных диапазонов регистрации флуоресцентного излучения для задачи обнаружения стрессовых состояний растений.

Такая задача представляет практический интерес при разработке бортовой лазерной аппаратуры контроля состояния растительности по результатам дистанционных измерений флуоресценции растений.

Для исследования спектров флуоресценции растений в нормальном и различных стрессовых состояниях была создана экспериментальная лабораторная установка, описание которой приведено в [4]. Для возбуждения флуоресценции (на длине волны 532 нм) была использована вторая гармоника Nd:YAG-лазера с диодной накачкой; измерялись спектры в диапазоне 595–800 нм.

Эксперименты проводились для нескольких видов растений (горчица, земляника, шалфей, лещина, огуречная трава, газонная трава, разные виды салата, огурцов, томатов). Стрессовые состояния вызывались различными способами: избыточным или недостаточным поливом, внесением в почву загрязнителей, механическими повреждениями – примятием или обрезанием листьев, обрезанием корней растений.

Во время экспериментов образцы растений ставились так, чтобы лазерное излучение попадало на их листья, которые находились приблизительно на одной высоте, и не попадало на почву. Видимый размер лазерного пятна на листьях составлял ~2,5 см.

На рис. 1 приведен пример результатов обработки спектров флуоресценции для газонной травы (из газонной смеси декора Agos) в нормальном и стрессовом состояниях, вызванных добавлением в почву железного купороса  $\text{FeSO}_4$  (5 г, разбавленные в 200 мл воды, на 3 образца; размеры горшков, в которых высаживались образцы растений,  $9 \times 9 \times 10$  см). Измерения проводились через 4 нед после внесения в почву загрязнителя.

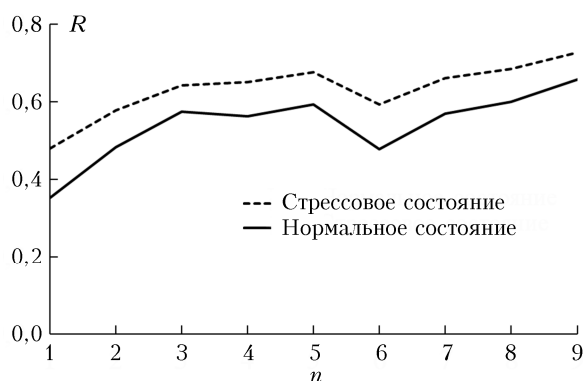


Рис. 1. Величина  $R$  для травы в нормальном состоянии и стрессовом состоянии, вызванном добавлением в почву железного купороса

На рис. 2 показаны результаты обработки спектров флуоресценции для кресс-салата в нормальном и стрессовом состояниях, вызванных отсутствием полива в течение 11 дней.

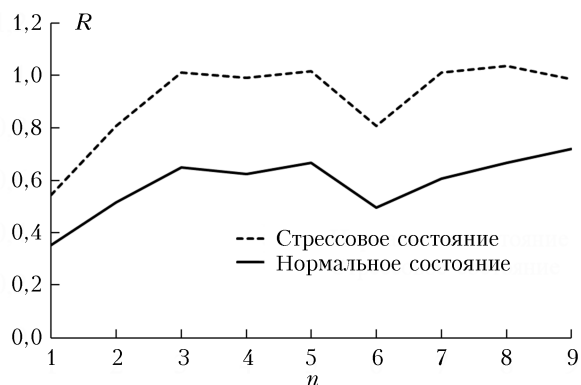


Рис. 2. Величина  $R$  для кресс-салата в нормальном состоянии и стрессовом состоянии, вызванном отсутствием полива

На рис. 1, 2 приведены средние (по серии измерений) значения отношения  $R$  (размер серии измерений в среднем ~10). По горизонтальной оси отложен номер ( $n$ ) используемого отношения  $R$ : 1 –  $R_{675/730}$ , 2 –  $R_{680/730}$ , 3 –  $R_{685/730}$ , 4 –  $R_{685/735}$ , 5 –  $R_{690/735}$ , 6 –  $R_{680/740}$ , 7 –  $R_{685/740}$ , 8 –  $R_{690/740}$ , 9 –  $R_{680-712/712-750}$ . Для  $n$  с 1 по 8 ширина спектральной полосы регистрации была выбрана 10 нм.

Видно, что величина  $R$  для стрессового состояния растений всегда больше величины  $R$  для нормального состояния. Однако их разница существенно зависит от вида растения, вида стресса и выбранных спектральных диапазонов регистрации флуоресцентного излучения.

В качестве параметра, характеризующего эффективность выбора спектральных диапазонов (в задаче обнаружения стрессовых состояний растений), возьмем среднее значение (по разным растениям и разным видам стресса, для которых проводились эксперименты) разности величин  $R$  для стрессового и нормального состояний растений ( $\Delta R$ ). Чем больше эта разность, тем больше надежность правильного обнаружения стрессовых состояний в условиях шумов и ошибок измерения.

На рис. 3 приведены средние значения и доверительные интервалы (для доверительной вероятности 95%)  $\Delta R$  при разных спектральных диапазонах регистрации. Средние значения и доверительные интервалы вычислялись по результатам обработки 11 серий измерений для стрессового и нормального состояний растений:

- 6 серий измерений для кресс-салата при стрессовых состояниях, вызванных, соответственно, примятием, обрезанием листьев, повреждением корневой системы растения, избыточным поливом растений в течение 17 дней, избыточным поливом в течение 24 дней, отсутствием полива в течение 11 дней; измерения спектров флуоресценции при механических повреждениях проводились в интервале времени от 20 до 40 мин после повреждения;

- 5 серий измерений для газонной травы при стрессовых состояниях, вызванных добавлением в почву разных загрязнителей: медного купороса  $\text{CuSO}_4$ , железного купороса  $\text{FeSO}_4$  и соли  $\text{NaCl}$ .

Для железного купороса и соли измерения проводились через 2 и 4 нед после внесения в почву загрязнителя; для медного купороса — через 4 нед.

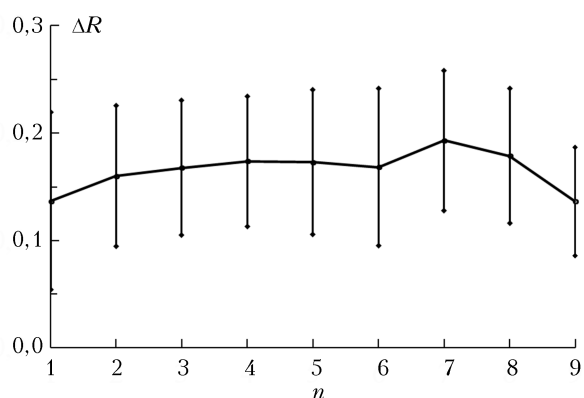


Рис. 3. Средние значения и доверительные интервалы величины  $\Delta R$  для разных спектральных диапазонов регистрации

Из рис. 3 видно, что величина  $\Delta R$  заметно больше для отношения  $R_{685/740}$  ( $n = 7$ ) (при выборе спектральных диапазонов регистрации с центральными длинами волн 685 и 740 нм), хотя максимум слабо выражен.

Сравнение результатов, приведенных на рис. 3, с результатами других авторов оказалось затруднительным. Для листовых растений нам удалось найти только одну работу [15], в которой для длины волны возбуждения 532 нм приводились бы результаты измерения спектров флуоресценции растений как в нормальном, так и в стрессовом состояниях (есть работа [13] и другие работы этих авторов для длины волны возбуждения 532 нм, но там приводятся спектры флуоресценции хвойных деревьев или результаты обработки для диапазонов регистрации с центральными длинами волн 685 и 740 нм).

На рис. 4 показаны результаты обработки спектров лазерно-индуцированной флуоресценции листьев кукурузы из работы [15]. Данные результаты относятся к верхней стороне листа. Стресс вызван дефицитом азотных удобрений (максимальный дефицит для приведенных в [15] данных — 20% от рекомендованной дозы азотных удобрений).

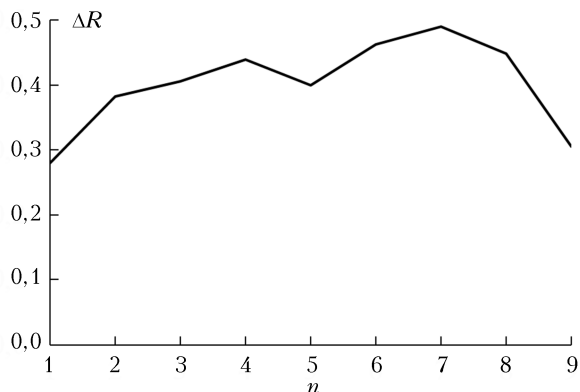


Рис. 4. Значения  $\Delta R$  листьев кукурузы для нормального и стрессового состояния, вызванного дефицитом азотных удобрений [15]

Общий ход кривой на рис. 4 совпадает с результатами, приведенными на рис. 3, и максимум величины  $\Delta R$  (здесь он выражен более отчетливо, чем на рис. 3) также наблюдается при выборе спектральных диапазонов регистрации с центральными длинами волн 685 и 740 нм.

Таким образом, анализ различных вариантов выбора спектральных диапазонов для лазерного флуоресцентного метода обнаружения стрессовых состояний растений показывает, что для длины волны возбуждения флуоресценции 532 нм с точки зрения надежности обнаружения стрессовых состояний лучше выбирать спектральные диапазоны регистрации флуоресцентного излучения с центральными длинами волн 685 и 740 нм.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 1965/14).

1. Panneton B., Guillaume S., Roger J.M., Samson G. Discrimination of corn from monocotyledonous weeds with ultraviolet (UV) induced fluorescence // Appl. Spectrosc. 2011. V. 65, N 1. P. 10–19.
2. Gouveia-Neto A.S., da Silva E.A., Oliveira R.A., Cunha P.C., Costa E.B., Câmara T.J.R., Willadino L.C. Water deficit and salt stress diagnosis through LED induced chlorophyll fluorescence analysis in *Jatropha curcas* L. oil plants for biodiesel // Proc. SPIE. 2011. V. 7902. P. 79020A-1–79020A-10.
3. Афонсенко А.В., Илакова А.И., Матвиенко Г.Г., Ошлаков В.К., Прокорьев В.Е. Лабораторные и лидарные измерения спектральных характеристик листьев березы в различные периоды вегетации // Оптика атмосф. и океана. 2012. Т. 25, № 3. С. 237–243.
4. Федотов Ю.В., Булло О.А., Белов М.Л., Городничев В.А. Устойчивость результатов лазерного флуоресцентного метода контроля состояния растений // Оптика атмосф. и океана. 2016. Т. 29, № 1. С. 80–84.
5. Zhi-qiang C., Wen-li C. Effects of NaCl on photosynthesis in *Arabidopsis* and *Thellungiella* leaves based on the fluorescence spectra, the fast Chlorophyll Fluorescence Induction Dynamics Analysis and the delayed fluorescence technique // Proc. SPIE. 2010. V. 7568. P. 756822-1–756822-8.
6. Gouveia-Neto A.S., da Silva E.A., Cunha P.C., Oliveira-Filho R.A., Silva L.M.H., da Costa E.B., Câmara T.J.R., Willadino L.G. Plant abiotic stress diagnostic by laser induced chlorophyll fluorescence spectral analysis of *in vivo* leaf tissue of biofuel species // Proc. SPIE. 2010. V. 7568. P. 75680G-1–75680G-8.
7. Grishaev M.V., Sal'nikova N.S. A setup for remote recording of the spectrum of laser-induced fluorescence from crowns of woody plants // Instrum. Exp. Tech. 2010. V. 53, N 5. P. 746–749.
8. Yanga J., Gong W., Shia S., Dua L., Suna J., Songe S. Laser-induced fluorescence characteristics of vegetation by a new excitation wavelength // Spectrosc. Lett. 2016. V. 49, N 4, P. 263–267.
9. Agati G., Biagi C., Mazzinghi P. Detection of the *in vivo* chlorophyll fluorescence spectrum: Effects of environmental factors and laser excitation parameters // Proc. SPIE. 1997. V. 3107. P. 33–39.
10. Saito K. Plant and vegetation monitoring using laser-induced fluorescence spectroscopy / T. Fukuchi, T. Shiina (eds.) // Industrial Applications of Laser Remote Sens. 2012. P. 99–114.
11. Pandey J.K., Gopal R. Laser-induced chlorophyll fluorescence and reflectance spectroscopy of cadmium

- treated *Triticum aestivum* L. plants // Spectrosc. 2011. V. 26, N 2. P. 129–139.
12. Pandey J.K., Gopal R. Laser-induced chlorophyll fluorescence: A technique for detection of dimethoate effect on chlorophyll content and photosynthetic activity of wheat plant // J. Fluoresc. 2011. V. 21, N 2. P. 785–791.
  13. Matvienko G., Timofeev V., Grishin A., Fateyeva N. Fluorescence lidar method for remote monitoring of effects on vegetation // Proc. SPIE. 2006. V. 6367. P. 63670F-1–63670F-8.
  14. Фатеева Н.Л., Клишкин А.В., Бендер О.В., Зотикова А.П., Ямбургов М.С. Исследование лазерно-индуцированной флуоресценции хвойных и лиственных растений при азотном загрязнении почвы // Оптика атмосф. и океана. 2006. Т. 19, № 2–3. С. 212–215.
  15. Middleton E., McMurtrey J.E., Entcheva Campbell P.K., Corp L.A., Butchera L.M., Chappellea E.W. Optical and fluorescence properties of corn leaves from different nitrogen regimes // Proc. SPIE. 2003. V. 4879. P. 72–83.
  16. Belasque J., Gasparoto M.C.G., Marcassa L.J. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy // Appl. Opt. 2008. V. 47, N 11. P. 1922–1926.
  17. Gopal R., Mishra K.B., Zeeshan M., Prasad S.M., Joshi M.M. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress // Curr. Sci. 2002. V. 83, N 7. P. 880–884.
  18. Cervantes-Martinez J., Flores-Hernandez R., Rodriguez-Garay B., Santacruz-Ruvalcaba F. Detection of bacterial infection of agave plants by laser-induced fluorescence // Appl. Opt. 2002. V. 41, N 13. P. 2541–2545.
  19. Rinderle U., Lichtenthaler H.K. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 as a possible indicator. Applications of chlorophyll fluorescence. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. P. 189–196.
  20. Sandhu R.K., Kim M.S., Krizek D.T., Middleton E.M. Fluorescence imaging and chlorophyll fluorescence to evaluate the role of EDU in UV-B protection in cucumber // Proc. SPIE. 1997. V. 3059. P. 42–51.

*Yu.V. Fedotov, O.A. Bullo, M.L. Belov, V.A. Gorodnichev.* **Choice of spectral bands for laser fluorescence method for detection of plant stress.**

Laser fluorescence method for detection of plant stress is considered. Processing results of experimental fluorescence spectra of plants in normal and different stress situations are given for a fluorescence excitation wavelength of 532 nm. Comparative analysis of different variants of spectral bands of plants fluorescence radiation recording is carried out. It is shown that for vegetation monitoring problem spectral bands with central wavelengths 685 и 740 nm are most efficient bands in the context of stress situations detection reliability.