

Контроль состояния растений методом лазерно-индуцированной флуоресценции

© М.Л. Белов, О.А. Булло, Ю.В. Федотов,
О.А. Матросова, В.А. Городничев

МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва, 105005, Россия

Приведено описание лазерного флуоресцентного метода контроля состояния растений. Показано, что при длине волны возбуждения 532 нм воздействие на растение стрессовых факторов, вызванных наличием загрязнителей в почве и механическим повреждением растений, существенно искажает спектр флуоресценции, что может быть положено в основу лазерного метода контроля состояния растений. Идентифицирующим фактором при наличии загрязнителей в почве является отношение интенсивностей флуоресценции на двух длинах волн 685 и 740 нм, а при механических повреждениях — нормированная интенсивность флуоресценции на длине волны 685 нм.

Ключевые слова: *лазерный метод, флуоресценция, растения, стрессовые состояния.*

Аналитические методы, основанные на анализе спектров лазерно-индуцированной флуоресценции, широко используются в науке и технике. Создание мощных лазеров позволило распространить методы флуоресцентного анализа на область дистанционного зондирования (см., например [1, 2]).

Метод лазерной индуцированной флуоресценции в настоящее время является одним из наиболее перспективных направлений контроля состояния растений [3–14] и обнаружения стрессовых состояний растений, вызванных недостаточным уровнем питательных веществ, наличием загрязнителей в почве или механическими повреждениями растений.

Отсутствие или недостаточный уровень питательных веществ, наличие загрязнителей в почве или механические повреждения и болезни растений приводят к стрессовым состояниям растений и невозможности их нормального роста. Такие стрессовые состояния сложно идентифицировать на ранних стадиях по внешнему виду растений. Поэтому важным является разработка методов и приборов дистанционного (неконтактного) обнаружения стрессовых состояний растений как индикаторов недостаточного уровня питательных веществ, наличия загрязнителей в почве или механических повреждений растений.

К настоящему времени накоплены экспериментальные данные по спектрам флуоресценции различных видов здоровых растений и рас-

тений, находящихся в различных стрессовых состояниях: недостаточная или избыточная влажность; механические повреждения; низкие или высокие температуры; недостаток питательных веществ и освещенности; засоление почвы; загрязнение почвы нефтепродуктами; повышенная кислотность почвы; наличие в почве различных пестицидов, гербицидов, инсектицидов и т. п.

Эти экспериментальные данные были получены на разной аппаратуре при различных длинах волн возбуждения в диапазоне 266...635 нм. Для возбуждения флуоресценции использовались лампы, светодиоды и разнообразные (полупроводниковые, газовые, твердотельные, эксимерные и др.) лазеры. Наибольшее число экспериментов посвящено исследованию флуоресценции растений при использовании (для возбуждения флуоресценции) лазеров на длинах волн 337 (азотный лазер), 355 и 532 нм (третья и вторая гармоники лазера на иттрий-алюминиевом гранате, активированном ионами неодима).

Наиболее важным информационным признаком флуоресценции растений является форма спектров флуоресцентного излучения. Поскольку спектры флуоресценции здоровых растений отличаются от спектров флуоресценции растений, находящихся в стрессовых ситуациях, это дает потенциальную возможность дистанционно обнаруживать стрессовые состояния растений путем регистрации спектра флуоресценции высаженных в теплицах растений, участков сельскохозяйственных угодий и т. п.

Вид спектров флуоресценции растений существенно зависит от длины волны возбуждения. Анализ спектров флуоресценции показывает, что достоверность контроля стрессовых состояний растений не зависит от длины волны возбуждения. Согласно результатам работы [14] (полученным на основе анализа спектров флуоресценции здоровых растений и растений, находящихся в стрессовом состоянии, при разных длинах волн возбуждения), наиболее ярко выраженные и наиболее устойчивые изменения в спектре флуоресценции растений (вызванных стрессом) происходят при длинах волн возбуждения в зеленой (например, на второй гармонике лазера на иттрий-алюминиевом гранате, активированном ионами неодима) или синезеленой областях спектра.

Для измерения спектров флуоресценции была создана лабораторная установка, структурная схема которой представлена на рис. 1. В качестве источника возбуждения излучения флуоресценции использована вторая гармоника YAG:Nd-лазера. Подсистема регистрации излучения флуоресценции построена на основе полихроматора и высокочувствительного матричного детектора с усилителем яркости [12].

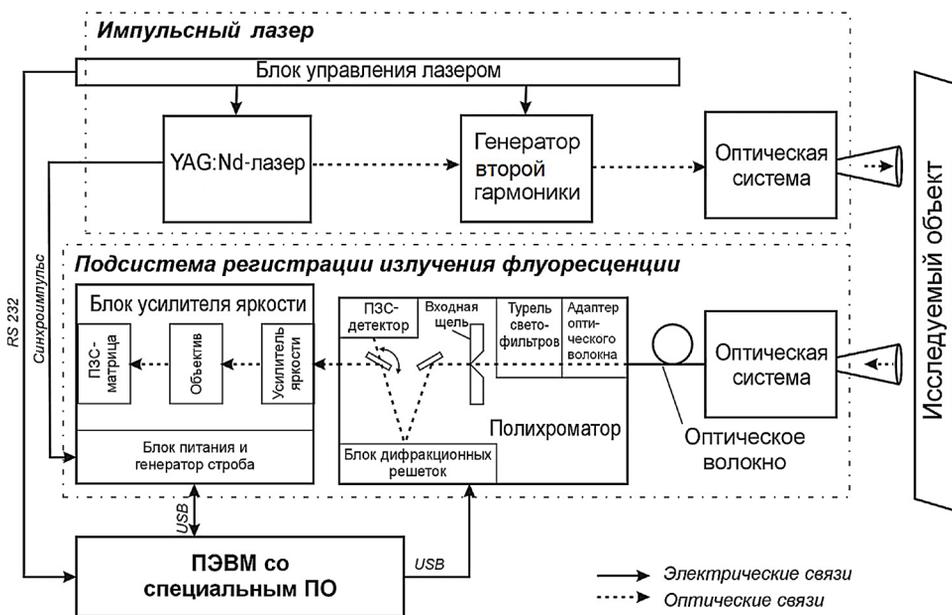


Рис. 1. Структурная схема лабораторной установки

В данной работе проводилось исследование спектров флуоресценции травы, выращенной из газонной смеси Декора Agos, состоящей из райграса пастбищного (ЭСКВАЭР 30 %), овсяницы красной (ФЕРОТА 15 %, МАКСИМА-1 30 % и МИСТИК 20 %), овсяницы овечьей (НОРДИК 5 %), находящейся в нормальном состоянии и при воздействии различных стрессовых факторов.

Было посажено 150 г газонной смеси. В качестве грунта использовали стандартный грунт для посадок. Траву высаживали в емкости размерами 9×9×10 см. У контрольных экземпляров высота травы достигала 8 см. Всего было посажено 24 образца, которые были впоследствии разделены на три группы по степени густоты.

На установке проводили измерения спектров флуоресценции в диапазоне длин волн 595...800 нм. Одновременно со спектром флуоресценции регистрировалась интенсивность упругорассеянного лазерного излучения на длине волны 532 нм.

Технические характеристики лабораторной установки приведены ниже:

Энергия импульса лазера, мДж	2,1
Длительность импульса, нс	6
Длина волны возбуждения, нм	532
Диапазон регистрации спектра, нм	595...800
Разрешение по спектру, нм	8
Диаметр приемного объектива, мм	15

На рис. 2–6 приведены примеры измеренных спектров флуоресценции образцов травы, находящейся в нормальном (без воздействия стрессовых факторов) и в различных стрессовых состояниях. На рис. 2–6 (а) приведены ненормированные спектры флуоресценции, а на рис. 2–6 (б) — нормированные (на сигнал упругого рассеяния на длине волны возбуждения 532 нм) спектры флуоресценции. Нормировка спектров флуоресценции необходима для того, чтобы убрать зависимость интенсивности измеренных спектров от параметров лабораторной установки (например, от расстояния до исследуемого растения, от энергии импульса источника возбуждения излучения флуоресценции и т. п.).

На рис. 2 представлены измеренные спектры флуоресценции травы в нормальном состоянии при различной ее густоте. Видно, что для ненормированных спектров флуоресценции интенсивность сильно

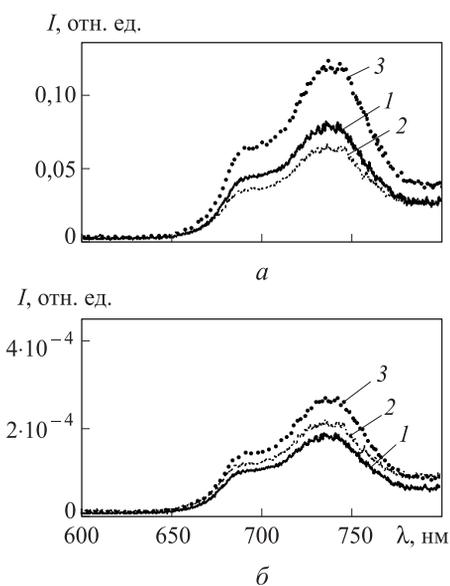


Рис. 2. Спектры флуоресценции травы, находящейся в нормальном состоянии, при различной густоте травы:

1–3 — низкая, средняя и высокая густота соответственно

зависит от степени густоты травы. Однако нормировка спектров флуоресценции существенно снижает эту зависимость.

На рис. 3, 4 приведены примеры типичных измеренных спектров лазерно-индуцированной флуоресценции травы, находящейся в различных стрессовых состояниях, вызванных наличием загрязнителей в почве. На рисунках кривые 1 и 2 соответствуют спектрам лазерно-индуцированной флуоресценции травы, находящейся в нормальном состоянии, через месяц после первых всходов травы и еще через две недели непосредственно перед внесением в почву загрязнителей. Кривые 3 соответствуют спектрам флуоресценции травы, находящейся в стрессовом состоянии через две недели после

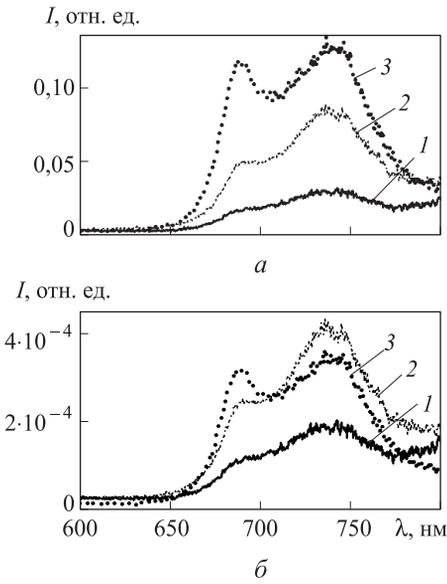


Рис. 3. Спектры флуоресценции травы, находящейся в стрессовом состоянии, вызванном внесением в почву железного купороса

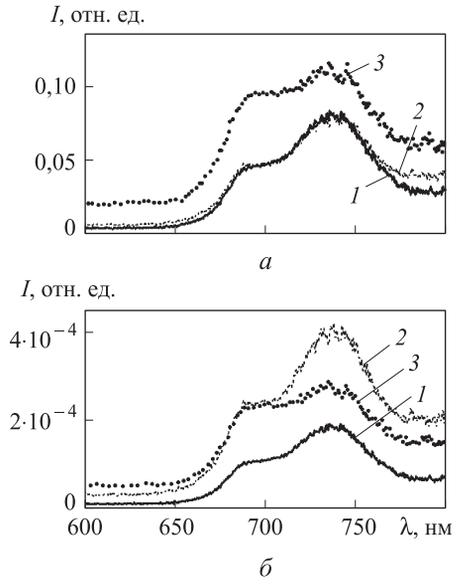


Рис. 4. Спектры флуоресценции травы, находящейся в стрессовом состоянии, вызванном внесением в почву соли

При этом интенсивность флуоресценции в максимуме на длине волны около 740 нм значительно больше, чем в максимуме на длине волны около 685...690 нм. Стресс растений, вызванный наличием загрязнителей в почве, приводит к тому, что разница интенсивностей в максимумах на длинах волн 740 и 685...690 нм становится незначительной (это хорошо видно на нормированных спектрах, см. рис. 3, б и 4, б).

Типичные измеренные спектры флуоресценции травы, находящейся в различных стрессовых состояниях, вызванных механическими повреждениями, например подрезанием на 5 см, приведены на рис. 5 и примятием травы — на рис. 6.

На рис. 5 и 6 кривые 1 и 2 — спектры флуоресценции травы, находящейся в нормальном состоянии, снятые через месяц и 10 дней после посадки травы и снятые непосредственно перед механическим воздействием соответственно; кривые 3–5 — спектры флуоресценции травы, находящейся в стрессовом состоянии, снятые сразу после механического воздействия, через три и через четыре дня после механического воздействия соответственно.

Сравнение нормированных (см. рис. 2–6 (б)) и ненормированных (см. рис. 2–6, (а)) спектров флуоресценции показывает, что они существенно различаются. Ненормированные спектры флуоресценции, несомненно, дают объективную картину для каждого конкрет-

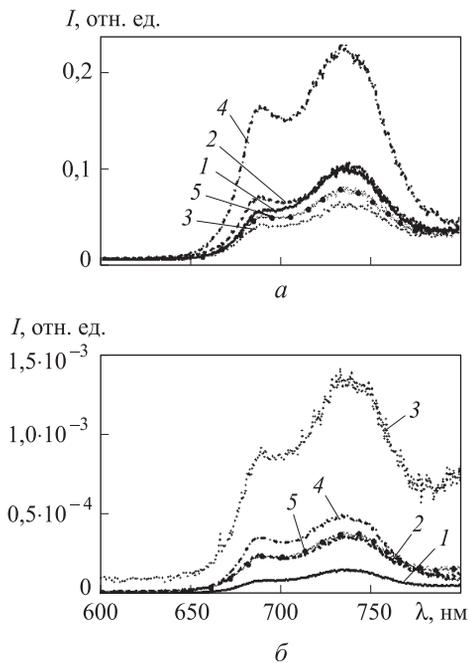


Рис. 5. Спектры флуоресценции травы, находящейся в стрессовом состоянии, вызванном обрезанием травы

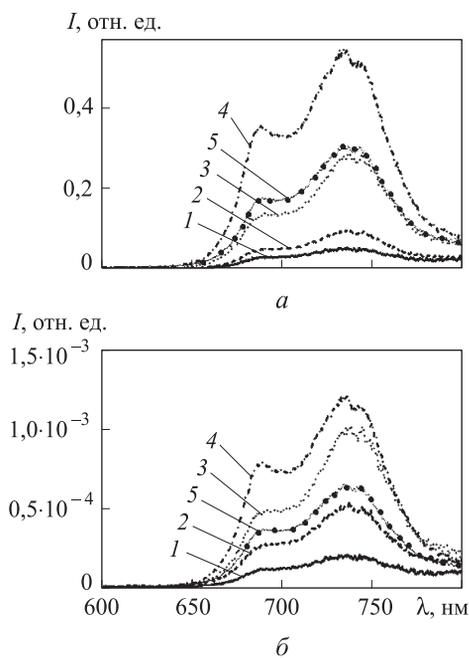


Рис. 6. Спектры флуоресценции травы, находящейся в стрессовом состоянии, вызванном примятием травы

ного измерения. Однако при обработке совокупности измерений, когда от измерения к измерению может изменяться энергия импульса лазера, проективное покрытие растений (при измерении разных образцов), наклон облучаемой поверхности по отношению к оптической оси лазера и т. п., характерные закономерности изменения спектров флуоресценции (вызванные стрессом растений) будут проявляться скорее при анализе нормированных спектров флуоресценции. При этом количественные характеристики закономерностей изменения спектров (вызванных стрессом растений) будут более устойчивые при анализе также нормированных спектров флуоресценции.

Анализ нормированных спектров флуоресценции после подрезания травы показывает, что влияние стрессового фактора проявляется в изменении уровня интенсивности флуоресценции. В течение нескольких дней наблюдается устойчивое увеличение интенсивности флуоресценции, существенно превышающее ее значение в случае нормального состояния растений. Для ненормированных спектров такого устойчивого (проявляющегося для всех образцов и для всех дат измерения) увеличения интенсивности флуоресценции не наблюдается.

Для стрессовых состояний травы, вызванных загрязнением почвы и механическими повреждениями, исследовали вероятности правильного обнаружения стрессов и ложных тревог. Для стресса, вызванного загрязнением почвы, в качестве идентифицирующего признака (растение, находящееся в нормальном или стрессовом состоянии) использовалось отношение $R_{685/740}$ интенсивностей флуоресценции на двух длинах волн 685 и 740 нм (интенсивности флуоресценции взяты в узком спектральном диапазоне длин волн 10 нм):

$$R_{685/740} = \frac{I(685)}{I(740)},$$

где $I(\lambda)$ — значение интенсивности флуоресценции на длине волны λ .

На рис. 7 приведено отношение $R_{685/740}$ для экспериментально измеренных спектров травы, находящейся в нормальном и стрессовых состояниях. Каждая точка на рисунке соответствует одному спектру из банка данных: черные кружки — стрессовым состояниям, белые квадраты — нормальному состоянию травы, прямая линия — пороговому значению $R_{685/740} = 0,65$. Видно, что сравнение отношения $R_{685/740}$ с его пороговым значением позволяет обнаружить стрессовые состояния травы, вызванные загрязнениями почвы.

Соответствия между номером i спектра и состоянием растения (видом стресса) на рис. 7 представлены в табл. 1.

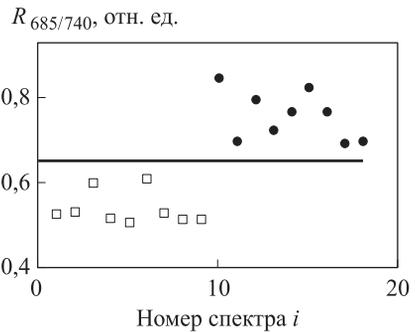


Рис. 7. Отношение $R_{685/740}$ для экспериментально измеренных спектров травы в нормальном и стрессовых состояниях

Таблица 1

Соответствие между номером i спектра и состоянием травы

Состояние растения	Стрессовый фактор	i
Нормальное	—	1–9
Стрессовое	FeSO ₄	10–12
	CuSO ₄	13–15
	NaCl	16–18

Для расчета вероятностей правильного обнаружения и ложных тревог для стрессовых ситуаций проводилось математическое моделирование. Считали, что значения интенсивности флуоресценции на

длинах волн 685 и 740 нм искажены шумом, распределенным по нормальному закону. Число реализаций шума задавали равным 10 000. Среднеквадратическое значение (СКЗ) шумов измерения изменялось в диапазоне 2...8 %. Полученные значения отношения $R_{685/740}$ сравнивали с пороговым значением. Если отношение $R_{685/740}$ больше порогового значения, то считалось, что растение находится в стрессовом состоянии, в противном случае состояние растения считалось нормальным.

Результаты математического моделирования в условиях шума измерения приведены в табл. 2. Видно, что вероятность правильного обнаружения для уровня шумов от 2 до 8 % имеет значение от 99,74 до 86,47 % при вероятности ложных тревог от 0,11 до 7,32 %.

Таблица 2

Результаты математического моделирования для стрессового состояния растений, вызванного загрязнениями почвы

СКЗ шума, %	Вероятность правильного обнаружения, %	Вероятность ложных тревог, %
8	86,47	7,32
6	91,20	4,60
4	95,91	2,18
2	99,74	0,11

Для стрессового состояния, вызванного механическими повреждениями травы, в качестве идентифицирующего признака (растение в нормальном или стрессовом состоянии) была использована нормированная интенсивность флуоресцентного сигнала на длине волны 685 нм. На рис. 8 представлена зависимость нормированной интенсивности флуоресценции на длине волны 685 нм (в спектральном диапазоне длин волн 10 нм) от номера спектра (объекта). В качестве объектов использованы спектры флуоресценции всех образцов газонной травы без стрессового воздействия и образцов «обрезанная трава» и «примятая трава» после воздействия стрессового фактора. Черные кружки соответствуют стрессовым состояниям травы, а белые квадраты —

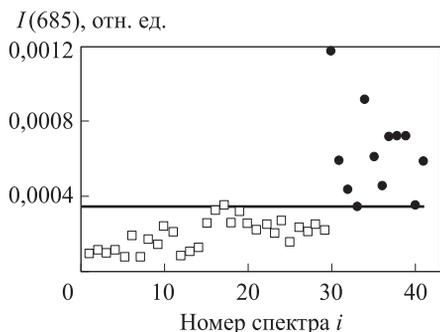


Рис. 8. Нормированная интенсивность флуоресценции на длине волны 685 нм для экспериментально измеренных спектров травы, находящейся в нормальном и стрессовых состояниях

нормальному состоянию, прямая линия соответствует пороговому значению $3,46 \cdot 10^{-4}$. Видно, что значение нормированной интенсивности флуоресценции на длине волны 685 нм позволяет обнаружить стрессовые состояния травы, вызванные механическим воздействием.

Для расчета вероятностей правильного обнаружения и ложных тревог при стрессовых ситуациях, вызванных механическими повреждениями, проводилось математическое моделирование. Результаты математического моделирования в условиях шума измерения приведены в табл. 3. Видно, что вероятность правильного обнаружения для уровня шумов от 2 до 8 % достигает приблизительно 91 % при уровне ложных тревог от 2,7 до 3,4 %. Отметим, что увеличения вероятностей правильного обнаружения и уменьшения вероятностей ложных тревог (для стрессовых состояний растений, вызванных как загрязнением почвы, так и механическими повреждениями растений) может быть использовано два идентифицирующего признака [14].

Таблица 3

**Результаты математического моделирования
для стрессового состояния растений, вызванного механическими
повреждениями травы**

СКЗ шума, %	Вероятность правильного обнаружения, %	Вероятность ложных тревог, %
8	91,62	3,41
6	91,71	3,01
4	91,65	2,61
2	91,76	2,77

Таким образом, экспериментальные исследования спектров флуоресценции растений для длины волны возбуждения 532 нм показывают, что действие на растение стрессовых факторов, обусловленное наличием загрязнителей в почве и механическим повреждением растений, существенно искажает спектр флуоресценции, что может быть положено в основу лазерного метода контроля состояния растений. Идентифицирующим фактором при наличии загрязнителей в почве является отношение интенсивностей флуоресценции на двух длинах волн 685 и 740 нм, а при механических повреждениях — нормированная интенсивность флуоресценции на длине волны 685 нм.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Межерис Р. *Лазерное дистанционное зондирование*. Москва, Мир, 1987, 550 с.
- [2] Федотов Ю.В., Белов М.Л., Матросова О.А., Козинцев В.И., Городничев В.А. Лазерный дистанционный метод классификации нефтяных за-

- грязнений, основанный на регистрации флуоресцентного излучения в четырех узких спектральных диапазонах. *Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Сер. Приборостроение*, 2011, № 3, с. 17–25.
- [3] Belasque J., Gasparoto M.C.G., Marcassa L.J. Detection of Mechanical and Disease Stresses in Citrus Plants by Fluorescence Spectroscopy. *Applied Optics*, 2008, vol. 47, no. 11, pp. 1922–1926.
- [4] Cecchi G., Bazzani M., Pantani L. Fluorescence Lidar Method for Remote Monitoring of Effects on Vegetation. *SPIE*, 1995, vol. 2585, pp. 49–56.
- [5] Middleton E., McMurtrey J.E., Encheva P.K. Campbell Optical and Fluorescence Properties of Corn Leaves from Different Nitrogen Regimes. *Proc. of SPIE*, 2003, vol. 4879, pp. 72–83.
- [6] Fateeva N.L., Matvienko G. G. Application of the Method of Laser-Induced Fluorescence. *Proc. of SPIE*, 2004, vol. 5232, pp. 652–657.
- [7] Matvienko G., Timofeev V., Grishin A., Fateeva N. Fluorescence Lidar Method for Remote Monitoring of Effects on Vegetation. *Proc. of SPIE*, 2006, vol. 63670F-1–63670F-8.
- [8] Фатеева Н.Л., Клишкин А.В., Бендер О.В., Зотикова А.П., Ямбуров М.С. Исследование лазерно-индуцированной флуоресценции хвойных и лиственных растений при азотном загрязнении почвы. *Оптика атмосферы и океана*, 2006, т. 19, № 2–3, с. 212–215.
- [9] Chappelle E.W., Corp L.A., McMurtrey J.E., Kim M.S., Daughtry C.S.T. Fluorescence: A Diagnostic Tool for the Detection of Stress in Plants. *SPIE*, 1997, vol. 2959, pp. 1–10.
- [10] Luedeker W., Guenther K.P., Dahn H.-G. Laser Induced Fluorescence a Tool for Vegetation Status- and Stress-Monitoring and Optical Aided Agriculture. *SPIE*, 1997, vol. 3059, pp. 63–75.
- [11] Gouveia-Neto A.S., Silva E.A., Oliveira R.A., Cunha P.C., Costa E.B, Camara T.J.R., Willadino L.G. Water Deficit and Salt Stress Diagnosis Through LED Induced Chlorophyll Fluorescence Analysis in *Jatropha Curcas* L. Oil Plants for Biodiesel. *Proc. of SPIE*, 2011, vol. 7902, pp. 79020A-1–79020A-10.
- [12] Федотов Ю.В., Булло О.А., Матросова О.А., Белов М.Л., Городничев В.А. Экспериментальное исследование лазерного флуоресцентного метода контроля состояния растений в стрессовых состояниях, вызванных механическими повреждениями. *Наука и образование. МГТУ им. Н.Э. Баумана*, 2012, № 11. URL: <http://technomag.edu.ru/doc/480063.html> (дата обращения 05.05.2013).
- [13] Федотов Ю.В., Булло О.А., Матросова О.А., Белов М.Л., Городничев В.А. Экспериментальное исследование лазерного флуоресцентного метода контроля стрессовых состояний растений, вызванных наличием загрязнителей в почве. *Наука и образование. МГТУ им. Н.Э. Баумана*, 2013, № 5. URL: <http://technomag.edu.ru/doc/565060.html> (дата обращения 05.05.2013).
- [14] Белов М.Л., Булло О.А., Городничев В.А. Лазерный флуоресцентный метод обнаружения стрессовых состояний растений, вызванных недостаточным уровнем питательных веществ или наличия загрязнителей в почве. *Наука и образование. МГТУ им. Н.Э. Баумана*, 2012, № 12. URL: <http://technomag.edu.ru/doc/506199.html> (дата обращения 05.05.2013).

Статья поступила в редакцию 03.07.2013

Ссылку на эту статью просим оформлять следующим образом:

Белов М.Л., Булло О.А., Федотов Ю.В., Матросова О.А., Городничев В.А.
Контроль состояния растений методом лазерно-индуцированной флуоресценции.
Инженерный журнал: наука и инновации, 2013, вып. 9.

URL: <http://engjournal.ru/catalog/pribor/optica/914.html>

Белов Михаил Леонидович родился в 1950 г., окончил МЭИ в 1973 г. Д-р. техн. наук, ведущий научный сотрудник НИИ радиоэлектроники и лазерной техники МГТУ им. Н.Э. Баумана. Автор более 200 научных работ в области лазерной локации и атмосферной оптики. e-mail: belov@bmsu.ru

Булло Ольга Алексеевна родилась в 1990 г. Студентка 6-го курса кафедры «Лазерные и оптико-электронные системы» МГТУ им. Н.Э. Баумана. Имеет 4 научные работы в области лазерной техники.

Федотов Юрий Викторович родился в 1974 г., окончил МГТУ им. Н.Э. Баумана в 1998 г. Канд. техн. наук, научный сотрудник НИИ радиоэлектроники и лазерной техники МГТУ им. Н.Э. Баумана. Автор более 50 научных работ в области лазерной техники.

Матросова Ольга Александровна родилась в 1987 г. Инженер НИИ радиоэлектроники и лазерной техники МГТУ им. Н.Э. Баумана. Имеет одну научную работу в области лазерной техники.

Городничев Виктор Александрович родился в 1952 г., окончил МГУ им. М.В. Ломоносова в 1976 г. Д-р. техн. наук, начальник отдела НИИ радиоэлектроники и лазерной техники МГТУ им. Н.Э. Баумана. Автор более 200 научных работ в области лазерной техники.