

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

ЛАЗЕРНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ У РАСТЕНИЙ СТРЕССОВЫХ СОСТОЯНИЙ, ВЫЗВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ

Описан лазерный флуоресцентный метод контроля состояния растений. Показано, что метод лазерной индуцированной флуоресценции может стать эффективным дистанционным или неконтактным методом обнаружения стрессовых состояний у растений, вызванных механическими повреждениями.

E-mail: ekomonit@bmstu.ru

Ключевые слова: лазерный метод, флуоресценция, растения, обнаружение стрессовых состояний.

Флуоресцентный анализ широко используется в науке и технике в качестве высокочувствительного аналитического средства [1—4]). Метод лазерной индуцированной флуоресценции является одним из наиболее перспективных направлений контроля состояния растительности и обнаружения стрессовых состояний у растений, обусловленных недостаточным уровнем питательных веществ или наличием загрязнителей в почве [5—14]. Однако кроме отсутствия или недостаточного уровня питательных веществ или наличия загрязнителей в почве стрессовые ситуации растений могут быть вызваны и различными механическими повреждениями, что может приводить к их болезням, нанося ущерб сельскому хозяйству.

Стрессовые состояния сложно идентифицировать на ранних стадиях по внешнему виду растений. Поэтому важным является разработка методов и приборов дистанционного (неконтактного) обнаружения стрессовых состояний у растений как индикаторов механических повреждений растений.

Эффективным дистанционным или неконтактным методом обнаружения стрессовых состояний у растений, вызванных механическими повреждениями, является метод лазерной индуцированной флуоресценции.

Принцип действия лазерного флуориметра основан на облучении растений лазером в ультрафиолетовом или видимом диапазонах (для возбуждения флуоресценции) и регистрации характеристик флуоресцентного излучения.

Поскольку спектры флуоресценции здоровых растений отличаются от спектров флуоресценции растений, находящихся в стрессо-

вых ситуациях, это позволяет обнаруживать стрессовые состояния у растений путем регистрации спектра флуоресценции высаженных в теплицах растений, участков сельскохозяйственных угодий и т. п.

В настоящее время имеются лишь отдельные экспериментальные работы [15—18], посвященные исследованию спектров флуоресценции растений, находящихся в стрессовых состояниях, вызванных различными механическими повреждениями.

В работе [15] проводились исследования спектров флуоресценции листа березы в нормальном состоянии и при разрезе листа. Аналогичные результаты представлены в работе [17] для листьев пастернака (*Pastinacca sativa*).

На рис. 1, а [15] схематически показан лист березы в двух проекциях (область разреза листа заштрихована). Зависимость интенсивности I флуоресценции на длине волны 400 нм от координаты x приведена на рис. 1, б. Измерения проводились в лабораторных условиях при возбуждении флуоресценции ХеСl-лазером на длине волны 308 нм через 5...30 мин после срывания листа с дерева. Измерения поврежденной части листа проводились на 3...4 мин позже, чем для неповрежденной части листа.

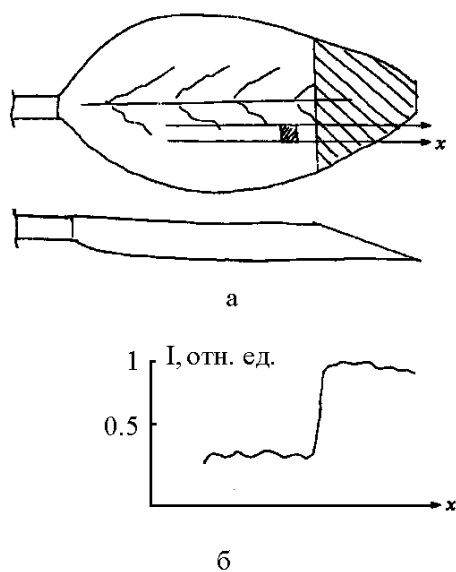


Рис. 1. Лист березы (а) и зависимость сигнала флуоресценции от координаты x (б)

На рис. 2 представлен спектр флуоресценции [15] листа березы в нормальном состоянии 1 и при разрезе 2. Видно, что разрезание листа приводит к увеличению интенсивности I лазерной индуцированной флуоресценции.

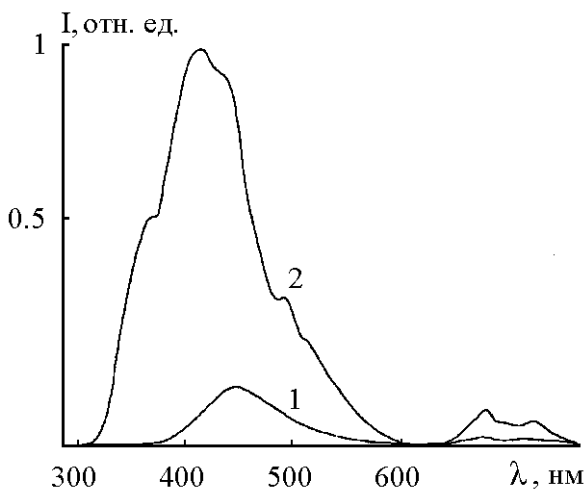


Рис. 2. Спектр флуоресценции листа березы в нормальном (1) и стрессовом (2) состояниях [15]

На рис. 3 и 4 представлены спектры флуоресценции при измерении в лабораторных условиях на длине волны возбуждения 470 ± 30 нм [16] листьев кукурузы (рис. 3) и редиса (рис. 4) в нормальном состоянии 1 и при их механическом повреждении (сдавливании). На рис. 3 представлены результаты наблюдения поврежденного образца через 4 мин после повреждения (кривая 2), на рис. 4 — через 2 мин (2); 8 мин (3) 10 мин (4) после повреждения.

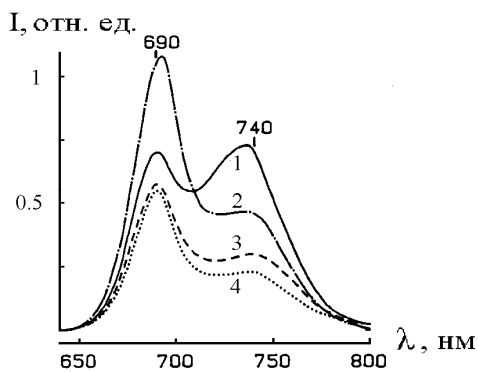
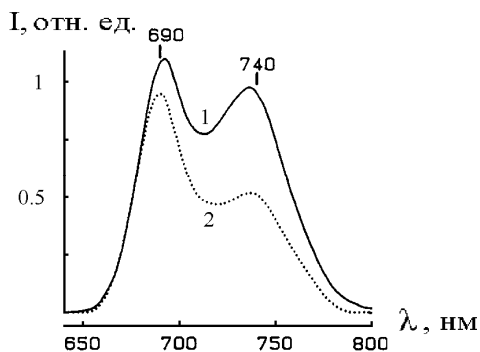


Рис. 3. Спектр флуоресценции листа кукурузы в нормальном (1) и стрессовом (2) состояниях [16]

Рис. 4. Спектр флуоресценции листа редиса в нормальном (1) и стрессовом (2—4) состояниях [16]

Видно, что при механическом повреждении листьев изменяется форма спектра флуоресценции — отношение интенсивности флуоресценции на длине волны 690 нм к интенсивности флуоресценции на длине волны 740 нм (или 735 нм).

На рис. 5 представлено изменение формы спектра флуоресценции листьев лимона на длине волны возбуждения флуоресценции 532 нм, где FM — отношение интенсивности флуоресценции в спектральном окне 680...712 нм к интенсивности флуоресценции в спектральном окне 712...750 нм при прокалывании листа лимона металлической иглой диаметром 0,56 мм в шести точках, черные квадраты — листья без механических повреждений (контрольные образцы), черные кружки — листья с механическими повреждениями, черные треугольники — пораженные раком листья без механических повреждений, обратные черные треугольники — пораженные раком листья с механическими повреждениями. Измерения показывают существенное изменение формы спектра флуоресценции как при болезни растения, так и при его механическом повреждении.

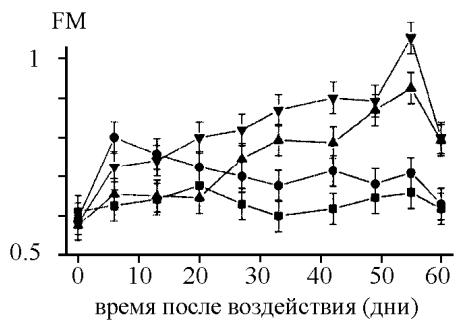


Рис. 5. Изменение формы спектра флуоресценции листа лимона [18]

В данной работе исследовали спектры флуоресценции газонной травы, находящейся в нормальном и в стрессовом состоянии после механического повреждения (подрезания травы). Было посажено 150 г газонной смеси Декора Aros. В качестве грунта использовали стандартный грунт для посадок. Состав газонной травы приведен ниже:

Семена для газонов	Состав, %
Райграс пастбищный ЭСКВАЭР	30
Овсяница красная ФЕРОТА	15
Овсяница красная МАКСИМА 1	30
Овсяница красная МИСТИК.....	20
Овсяница овечья НОРДИК.....	5

Траву высаживали в емкости размерами 9×9×10 см. У контрольных (не подрезанных) экземпляров высота травы достигала 8 см. Всего было посажено 24 образца, которые впоследствии были разделены на три группы по степени густоты травы.

Для измерения спектров лазерной индуцированной флуоресценции растений разработана лабораторная установка. 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.

Основные характеристики экспериментальной установки

Энергия импульса, мДж	0,7
Длительность импульса, нс	6
Длина волны возбуждения, нм.....	266
Диапазон регистрации спектра, нм.....	295...700
Разрешение по спектру, нм	5
Диаметр приемного объектива, мм	15

На установке были проведены измерения спектров флуоресценции газонной травы в диапазоне 595...800 нм через 3—4 дня после подрезания травы. Одновременно со спектром флуоресценции регистрировалась интенсивность упруго рассеянного излучения на длине волны 532 нм.

На рис. 6 представлены результаты экспериментальных исследований, проведенных в данной работе при длине волны возбуждения 532 нм (использование длины волны 532 нм для возбуждения флуоресценции наиболее эффективно для контроля состояния растений).

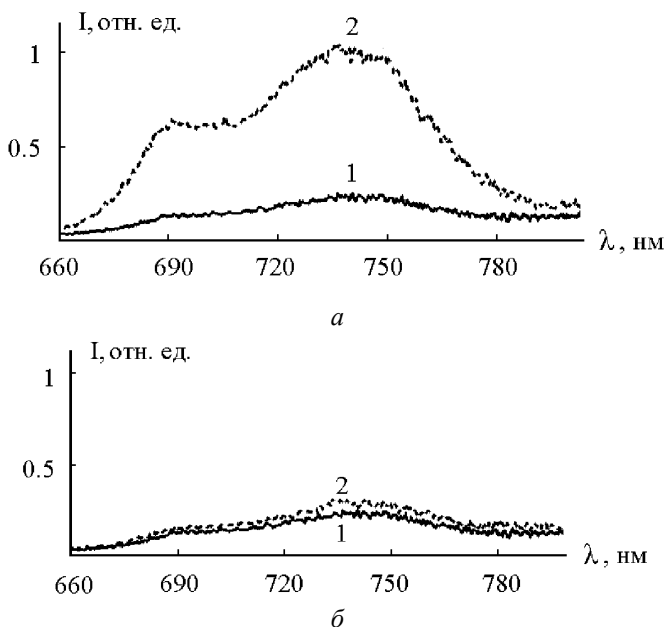


Рис. 6. Спектры флуоресценции газонной травы в нормальном состоянии и при механическом повреждении (подрезании):

a, б — максимальное и минимальное отличие спектров от спектра контрольного образца; *1* — контрольный образец; *2* — образец в стрессовом состоянии, вызванном механическим повреждением

Видно, что спектр флуоресценции растений при их механическом повреждении сильно зависит от многих факторов: длины волны возбуждения флуоресценции, вида растений, вида механического повреждения и времени, прошедшего после механического повреждения.

В большинстве случаев данные экспериментальных исследований показывают, что влияние стрессового фактора проявляется в изменении интенсивности флуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции существенно превышает ее значение для нормального состояния растений.

Таким образом, анализ результатов имеющихся (пока немногочисленных) экспериментов показывает, что метод лазерной индуцированной флуоресценции может стать эффективным дистанционным или неконтактным методом обнаружения стрессовых состояний у растений, вызванных механическими повреждениями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ме ж е р и с Р. Лазерное дистанционное зондирование. М.: Мир, 1987. 550 с.
2. Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation / Emmett W. Chappelle [et al.] // Applied Optics. 1984. Vol. 23. No 1. P. 134–138.
3. Laser-induced fluorescence of green plants. 2: LIF caused by nutrient deficiencies in corn / Emmett W. Chappelle et al. // Applied Optics. 1984. Vol. 23. No. 1. P. 139–142.
4. Cecchi G., Bazzani M., Pantani L. Fluorescence lidar method for remote monitoring of effects on vegetation // SPIE. 1995. Vol. 2585. P. 48–56.
5. 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. P. 63–75.
6. Fluorescence: A Diagnostic tool for the detection of stress in plants / Emmett W. Chappelle [et al.] // SPIE. 1997. Vol. 2959. P. 1–10.
7. Fateeva N. L., Matvienko G. G. Application of the method of laser-induced fluorescence // Proc. of SPIE. 2004. Vol. 5232. P. 652–657.
8. Fluorescence lidar method for remote monitoring of effects on vegetation / G. Matvienko et al. // Proc. of SPIE. 2006. Vol. 6367. P. 63670F-1–63670F-8.
9. Исследование лазерно-индуцированной флуоресценции хвойных и лиственных растений при азотном загрязнении почвы / Н.Л. Фатеева и др. // Оптика атмосферы и океана. 2006. Т. 19. № 2–3. С. 212–215.
10. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy / J. Belasque et al. // Applied Optics. 2008. Vol. 47. No 11. P. 1922–1926.
11. Water deficit and salt stress diagnosis through LED induced chlorophyll fluorescence analysis in *Jatropha curcas* L. oil plants for biodiesel / A.S. Gouveia-Neto [et al.] // Proc. of SPIE. 2011. Vol. 7902. P. 79020A-1–79020A-10.
12. Maurya R., Prasad S. M., Gopal R. LIF technique offers the potential for the detection of cadmium-induced alteration in photosynthetic activities of *Zea Mays* L. // Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. 2008. Vol. 9. P. 29–35.
13. 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. P. 72–83.

14. Заворуев В. В., Заворуева Е. Н. Флуоресценция листьев тополей, растущих вблизи автомобильных дорог // *Оптика атмосферы и океана*. 2011. Т. 24. № 5. С. 437–440.
15. Remote sounding of vegetation characteristics by laser induced fluorescence / G. Matvienko et al. // *SPIE*. 1999. Vol. 3707. P. 524–532.
16. Hurtmut K. L., Rinderle U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress condition in plants / G. Matvienko et al. // *Critical reviews in Analytical chemistry*. 1988. Vol. 19. P. S29–S85.
17. Нестеренко Т. В., Тихомиров А. А., Шихов В. Н. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям // *Журнал общей биологии*. 2007. Т. 68. № 6. С. 444–458.
18. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy / J. Belasque et al. // *Applied Optics*. 2008. Vol. 47. No. 11. P. 1922–1926.

Статья поступила в редакцию 28.09.2012.