

具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪的开发研究

夏倩¹, 汤浩¹, 葛玮¹, 付丽疆¹, 仝德之², 郭亚^{1*}¹江南大学物联网工程学院轻工过程先进控制教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122;²绿视芯科技(无锡)有限公司, 江苏 无锡 214000

摘要 叶绿素荧光检测技术作为一种无损检测技术应用十分广泛。传统叶绿素荧光检测技术激发信号时使用的阶跃或调制脉冲(PAM)频带窄,而光合系统是一个高阶的宽带系统,难以激发出光合系统所有的动态特性,使叶绿素荧光信号含有的信息丰富度受限。目前市面上的叶绿素荧光仪均不具备宽带激励功能,限制了新兴的人工智能算法能够处理复杂信号、挖掘丰富信息的能力。针对该问题,基于伪随机二进制序列(PRBS)信号,设计开发了一套具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪。该仪器同时能测量传统的叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP)与PAM曲线,对5种不同植物在3种激发光下的叶绿素荧光的信息熵进行对比,结果表明,PRBS激发的叶绿素荧光具有最高的信息熵。该仪器能够提供信息更丰富的叶绿素荧光信号,有望为植物生理及环境胁迫检测提供新型的科学仪器。

关键词 叶绿素荧光; 宽带激励; 叶绿素荧光仪; 信息熵

中图分类号 TH741

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP230719

Research and Development of Chlorophyll Fluorescence Meter with Broadband Excitation Function

Xia Qian¹, Tang Hao¹, Ge Wei¹, Fu Lijiang¹, Tong Dezhi², Guo Ya^{1*}¹Key Laboratory of Advanced Process Control for Light Industry, Ministry of Education, School of Internet of Things Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;²Chlovie Science and Technology (Wuxi) Co., Ltd., Wuxi 214000, Jiangsu, China

Abstract Chlorophyll fluorescence detection technology is widely used as a nondestructive detection method; however, the frequency band of the step pulse or the modulated pulse (PAM) used in the traditional chlorophyll fluorescence detection technology to excite signals is narrow, and a photosynthetic system is a high-order broadband system, which is difficult to excite all the dynamic characteristics. These limit the information richness contained in chlorophyll fluorescence signals. Currently available commercial chlorophyll fluorescence meters do not contain broadband excitation. The absence of this function limits the ability of emerging artificial intelligence algorithms to process complex signals for mining rich information. Thus, in this study, we developed a chlorophyll fluorescence instrument with a broadband excitation function based on the pseudorandom binary sequence (PRBS) signal. The developed instrument can measure the traditional chlorophyll fluorescence induction OJIP and PAM kinetics. The information entropy of chlorophyll fluorescence of five different plants under three different light sources confirmed that the chlorophyll fluorescence excited by PRBS has the highest information entropy. In addition, the instrument can provide chlorophyll fluorescence signals with more information and is expected to contribute to a new scientific instrument for detecting plant physiology and environmental stress.

Key words chlorophyll fluorescence; broadband excitation; chlorophyll fluorescence meter; information entropy

1 引言

在光合作用过程中,光系统 II(PSII)叶绿素分子

会受到光的激发,由基态跃迁至激发态,处于激发态的叶绿素分子可以通过热耗散、叶绿素荧光释放、光化学反应 3 种方式释放能量回到基态。由于这 3 种方式紧

收稿日期: 2023-02-27; 修回日期: 2023-03-21; 录用日期: 2023-04-04; 网络首发日期: 2023-05-09

基金项目: 国家自然科学基金国际合作项目 (51961125102)、国家自然科学基金面上项目 (31771680)、江苏省农业科技自主创新资金项目 (SCX(22)3669)

通信作者: *guoya68@163.com

密耦合,任何一个的变化必然会影响另外两个的动态过程。任何影响光合作用的因素都会影响叶绿素荧光的释放,因此叶绿素荧光可以用于感知和测量这些因素^[1]。目前叶绿素荧光已广泛地应用于植物学的研究和作物胁迫的测定^[2-3],例如,用于识别病毒感染^[4]、叶片老化^[5]、除草剂种类^[6]、需肥状况^[7]、盐胁迫^[8]、高低温胁迫^[9]、重金属含量^[10]等。

传统测试方法使用阶跃信号或调制脉冲(PAM)信号激励植物叶片产生叶绿素荧光^[2,11],激励方案简单,同时在分析中将对从叶绿素荧光特征曲线上取出的少数的特征点进行简单代数运算得出的数值作为叶绿素荧光参数,并将其用于统计分析。而传统的PSII叶绿素荧光激发信号属于窄带信号,频率成分较少。虽然从理论上讲,任何影响光合作用的因素都有可能通过叶绿素荧光检测出来,但是若使用传统的激励手段和分析方法,往往难以得到令人满意的结果,有时结果甚至相互矛盾。Burns等^[12]研究了利用叶绿素荧光检测黄龙病(HLB, *candidatus liberibacter asiaticus*)的方法,但并没有找到单一的荧光参数用于测量HLB。Ranjbarfordoei等^[13]和Jafarinia等^[14]研究了利用叶绿素荧光参数(F_v/F_o ,暗适应下PSII光化学最大初级产量)测量植物盐胁迫的方法,但得出的结论相互矛盾,其中 F_v 为暗适应下可变荧光产量, F_o 为暗适应下初始荧光。有大量的研究表明,叶绿素荧光参数(F_v/F_m ,暗适应下PSII最大光化学量子产量)是个很好的干旱测量指标,但是也有一些研究结果不支持这个结论,请参见特邀综述论文^[2],其中, F_m 为暗适应下最大荧光产量。

光合作用过程涉及众多的光化学反应,而这些光化学反应中的化学反应速度相差甚远,有的甚至达好几个量级,这意味着光合系统是一个高阶的宽带系统。PSII电子传递具有很好的周期重复性,在对环境的激励响应方面会表现出一定的时变特性,不同的生理变化将会影响叶绿素荧光不同的时频特性。如果想提高叶绿素荧光的分析潜力,必须使用更为复杂的数据处理方法,例如频谱分析、小波分析、经验模态分解、机理模型或基于人工智能的数据模型^[15-17]等。根据系统动力学理论,高阶系统的模型参数估算依赖于对系统的充分激励,以获取能够充分反映系统动态特性的输出数据,实现系统参数的可靠辨识。学术界公认激励信号的丰富性能够提高模型参数识别的准确性^[18],这就要求激励信号具有足够的带宽和丰富的频率成分。

我国目前使用的叶绿素荧光仪大都依赖进口,即使是国外的叶绿素荧光仪,也缺乏宽带激励功能,因此研究开发具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪具有重要的科学价值。对于宽带激励信号,通常有白噪声^[19]、伪随机二进制序列(PRBS)信号^[20]、扫频正弦^[21]等,其中PRBS信号在电路上易实现,作为激励源有广泛的应

用,因此本文基于PRBS设计开发了具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪。

2 具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪的设计与实现

2.1 设计方案

植物光合系统吸收蓝光,释放出红色叶绿素荧光,因此选用450 nm波长的LED作为激发光源,设计多通道耦合式光纤保证光路的走向,通过结合石英柱与光纤保证激发光的均匀性;采用光电二极管作为荧光的接收器,并在接收器上覆盖680~750 nm带通滤波器,然后通过信号处理、系统分析将数据存储并可视化在显示屏上。该仪器能实现OJIP、PAM以及PRBS三种测量协议,各参数均能灵活设置。

便携式叶绿素荧光仪的硬件系统结构如图1所示。以微控制单元(MCU)为控制核心,搭载USB通信接口、SD卡及4通道转换器(DAC),通过恒流驱动电路控制LED灯,LED灯与光电二极管之间通过光纤进行耦合,方便荧光信号的回传。光电二极管采用光导模式将荧光信号转换成电信号,电信号经多级放大电路、可编程可调增益放大电路、信号调理电路,最后被MCU采集。软件方面主要的编写业务逻辑包括显示屏的交互程序、SD卡驱动程序等,其中最重要的是完成OJIP、PAM以及PRBS三种测试协议的编写,并通过大量测试保证数据的准确性和稳定性。图2展示了便携式叶绿素荧光仪的实物图。

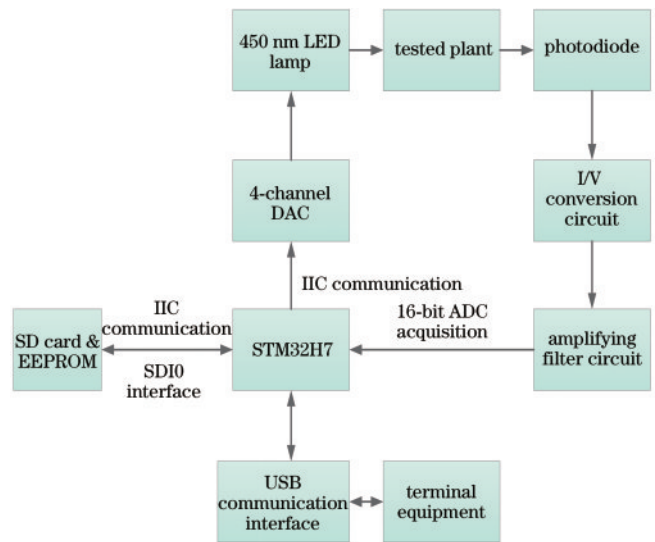


图1 便携式叶绿素荧光仪的硬件系统结构

Fig.1 Hardware system structure of the portable chlorophyll fluorescence instrument

该仪器的耦合光纤如图3所示,其中1是光纤头部石英柱,2是LED入射光路,3是叶绿素荧光反射光路,三个通道同时会聚到一处。该方式设计灵活,可以延长光纤的长度,供多种场景使用。



图 2 便携式叶绿素荧光仪的实物图
Fig. 2 Physical picture of the portable chlorophyll fluorescence meter

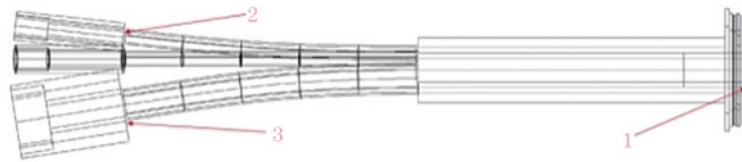


图 3 耦合式光纤外形

Fig. 3 Outline of coupled optical fiber

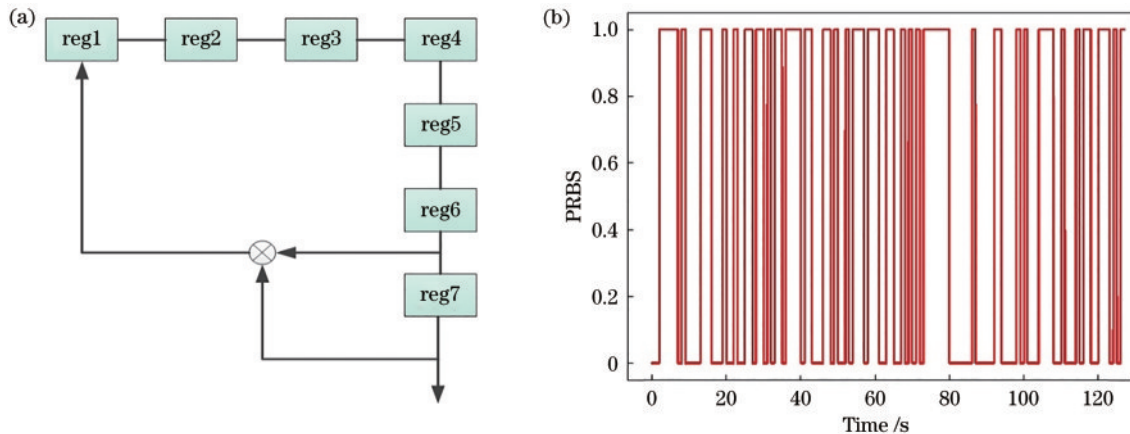


图 4 PRBS 生成。(a) PRBS7 序列生成原理；(b) PRBS7 理论波形图

Fig. 4 PRBS generation. (a) Principle of PRBS7 generation; (b) theoretical waveform diagram of PRBS7

根据理论描述,可以借助软件产生 PRBS7 序列,为了方便进行数据可视化,对每一位再进行重采样,将该序列用于叶绿素荧光仪的激发信号,可产生类似图 4(b) 的激发光信号,且上下限均可通过程序设置。此种激励方式比传统的阶跃信号激励和 PAM 信号激励具有更复杂的变化模式,从而使得获取的叶绿素荧光信号能包含更加丰富的信息。

3 实验

3.1 线性度测试

线性度测试过程中采用型号为 ST-9813 的希玛光亮度测试仪器作为叶绿素荧光仪激光光强的检测设备,最大测量光亮度达 100000 lx,精度为 $\pm(3\%x + 5 \text{ lx})$, x 为测量值,光谱范围为 320~730 nm。首先将仪器与检测设备的位置固定好,避免设备移动带来的

2.2 具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪实现

PRBS 是一种由二进制位组成的序列,具有伪随机性。它由一个称为种子的初始值开始,然后根据一组特定的规则进行变换,从而产生一系列的二进制位,这个规则可以根据需求来制定。本文利用 7 个移位寄存器来产生该序列 (PRBS7),生成的多项式为

$$x^7 + x^6 + 1 = 0. \quad (1)$$

PRBS7 的生成原理如图 4(a) 所示,其中每个寄存器都产生独立的随机数,整个序列使用 7 位级联反馈移位寄存器,其输入是一个 7 位的序列,输出的序列长度为 $2^7 - 1$,输出受输入和自身的影响,因此可以产生一个随机的序列。

误差;然后将荧光仪的激发光强从 10% 开始设置,每 5% 为一个梯度,直到 95%,每个梯度设置好之后点击测试,同时记录检测设备上显示的光强,其中叶绿素荧光仪的最大饱和光强度为 $4200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。测试结束后得到 18 个数据点,对这些数据进行一阶拟合和线性度分析,得到如图 5 所示的结果,由图 5 可知,LED 电流与激发光强度之间的线性度非常高 ($R^2 = 0.999$)。

3.2 OJIP、PAM 及宽带测试效果

对仪器进行三种协议 (OJIP、PAM 及 PRBS) 叶绿素荧光获取功能测试,结果分别如图 6(a)~(c) 所示,其中图上的叶绿素荧光仪是实际加工的样品。在图 6(a) 的测试中, OJIP 激发光强度为最大光强的 70%;在图 6(b) 的测试中, PAM 饱和光强设置为最大光强的 70%, 测量光强设置为最大光强的 25%, 光化强度设置为最大光强的 25%;在图 6(c) 的测试中,

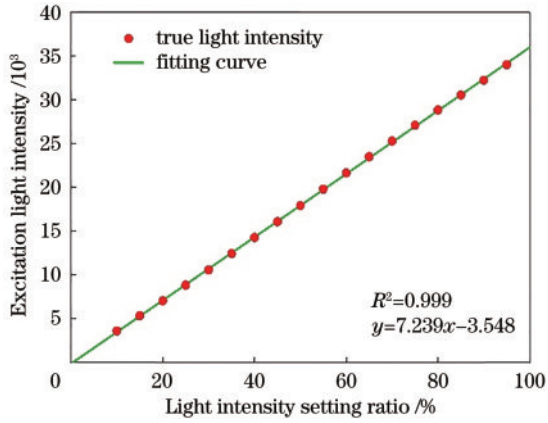


图 5 光强设置比与激发光强的关系

Fig. 5 Relationship between light intensity setting ratio and excitation light intensity

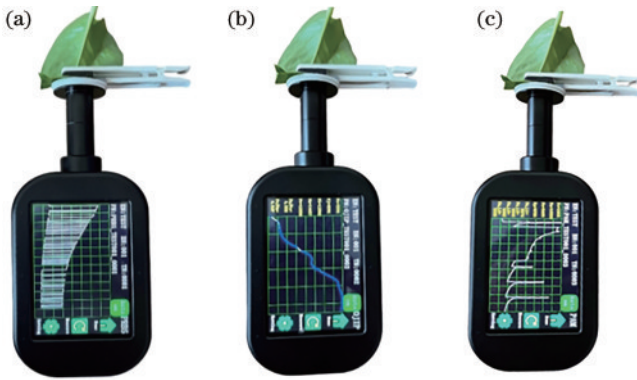


图 6 三种叶绿素荧光获取功能测试结果。(a) 阶跃信号激发; (b) PAM 脉冲激发; (c) PRBS 信号激发

Fig. 6 Chlorophyll fluorescence acquisition function test. (a) Excited by a step signal; (b) excited by a PAM signal; (c) excited by a PRBS signal

PRBS 上限光强设置为最大光强的 70%，下限光强设置为最大光强的 20%。

3.3 三种协议测试的叶绿素荧光信息丰富度比较

信息熵是衡量信号信息丰富度的度量指标, 本实验选用 5 种植物样本, 分别为冬青卫矛 (*Euonymus japonicus* Thunb.)、桂花 (*Osmanthus* sp.)、茶花 (*Camellia* sp.)、菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 与生菜 (*Lactuca sativa* var. *ramosa* Hort.)。冬青卫矛、桂花与茶花采集于江南大学校园内, 菠菜与生菜购买于生鲜超市。每种植物各 10 片叶子, 为了减少不同叶片对分析结果产生的影响, 将同一片叶子分为 3 部分, 如图 7 所示, 分别使用阶跃信号、PAM 信号以及 PRBS 信号的激励获得叶绿素荧光信号。其中阶跃光强设置为最大光强的 70%, PAM 的饱和光强、光化光强及测量光强分别设置为最大光强的 70%、30% 及 30%。PRBS 的高光强与低光强分别设置为最大光强的 70% 与 30%。在测量叶绿素荧光前需要使用暗适应夹子对叶子进行暗适应, 至少 20 min。



图 7 茶花叶子分割

Fig. 7 *Camellia* sp. segmentation

$$P_i = \frac{|x_i|^2}{\sum_{i=1}^n |x_i|^2}, \quad (2)$$

式中: P_i 表示叶绿素荧光信号中第 i 值占总叶绿素荧光的比例; x 表示叶绿素荧光信号; $i=1, 2, \dots, n$, n 是叶绿素荧光信号的长度。叶绿素荧光信号的信息熵计算公式为

$$H_i = -\sum_{i=1}^n P_i \log P_i. \quad (3)$$

表 1 给出了叶绿素荧光信息熵的均值。结果表明, 5 种植物样本中 PRBS 信号激励的叶绿素荧光均具有最高的信息熵, 验证了宽带信号激励下能够产生含有最丰富信息的叶绿素荧光信号的结论。

表 1 阶跃、PAM 与 PRBS 激励下叶绿素荧光的信息熵

Table 1 Information entropy of chlorophyll fluorescence under step, PAM, and PRBS excitations

Sample	OJIP	PAM	PRBS
<i>Euonymus japonicus</i> Thunb.	6.010	4.585	8.721
<i>Osmanthus</i> sp.	5.961	4.452	8.801
<i>Camellia</i> sp.	5.991	4.611	8.815
<i>Spinacia oleracea</i> L.	5.975	4.603	8.904
<i>Lactuca sativa</i> var. <i>ramosa</i> Hort.	5.978	4.350	8.926

本文研究开发的具有宽带激励的叶绿素荧光仪器弥补了传统激励信号频带窄的缺点。目前蓬勃发展的的人工智能算法的可靠分析依赖于丰富的大数据, 频谱分析、小波分析、经验模态分析等常用信号处理手段的作用发挥也需要丰富的信号。本文开发的具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪可以获得丰富的叶绿素荧光信号, 为高级的数据处理方法提供更加丰富的原始数据, 有望在光合生理及环境胁迫方面得到更多的研究和引领叶绿素荧光研究的进展。

在未来的研究中, 如何从宽带激励的叶绿素荧光信号中提取更多有效的特征、如何利用机器学习方法分析宽带信号激励下的叶绿素荧光信号、如何利用宽带激励的叶绿素荧光信号在时域、频域和小波域检测植物生理与胁迫状态方面均具有广阔的研究空间, 本文仪器的成功开发为这些前沿的研究提供了科学仪器, 使这些研究变得可能。

4 结 论

设计开发了一款具有宽带激励功能的叶绿素荧光仪,该仪器具有便携、人机交互友好以及多种荧光激励方式的优点。多种荧光激励信号测试实验表明,宽带激发的叶绿素荧光信号拥有更高的信息熵,证实 PRBS 激励的叶绿素荧光信号具有丰富的信息。该仪器有望为基于叶绿素荧光的植物生理学及环境胁迫的检测与研究提供更加丰富的数据,让叶绿素荧光在植物相关检测领域发挥出更大的潜力价值,能够支撑更多具有开创性的研究。

参 考 文 献

- [1] Tyystjärvi E, Vass I. Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence[M]//Papageorgiou G C, Govindjee. Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration. Dordrecht: Springer, 2004, 19: 363-388.
- [2] Guo Y, Tan J L. Recent advances in the application of chlorophyll a fluorescence from photosystem II[J]. Photochemistry and Photobiology, 2015, 91(1): 1-14.
- [3] Xia Q, Fu L J, Tang H, et al. Sensing and classification of rice (*Oryza sativa* L.) drought stress levels based on chlorophyll fluorescence[J]. Photosynthetica, 2022, 60: 102-109.
- [4] Suárez J C, Vanegas J I, Contreras A T, et al. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool for evaluating disease resistance of common bean lines in the western Amazon region of Colombia[J]. Plants, 2022, 11(10): 1371.
- [5] Doğru A, Çakırlar H. Effects of leaf age on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes activity in winter rapeseed leaves under cold acclimation conditions[J]. Brazilian Journal of Botany, 2020, 43(1): 11-20.
- [6] 程文超, 李光宁, 强胜, 等. 0.136% 赤·吡乙·芸苔可湿性粉剂与五氟磺草胺混用对无芒稗和水稻生长的影响[J]. 植物保护, 2022, 48(2): 94-100, 105.
Cheng W C, Li G N, Qiang S, et al. Effects of GA·IAA·BR 0.136% wettable powder mixed with penoxsulam on the growth of *Echinochloa crus-galli* var. *mitis* and *Oryza sativa*[J]. Plant Protection, 2022, 48(2): 94-100, 105.
- [7] Latifinia E, Eisvand H R. Soybean physiological properties and grain quality responses to nutrients, and predicting nutrient deficiency using chlorophyll fluorescence[J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2022, 22(2): 1942-1954.
- [8] Stefanov M A, Rashkov G D, Apostolova E L. Assessment of the photosynthetic apparatus functions by chlorophyll fluorescence and P_{700} absorbance in C3 and C4 plants under physiological conditions and under salt stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(7): 3768.
- [9] Xia Q, Tan J L, Cheng S Y, et al. Sensing plant physiology and environmental stress by automatically tracking F_0 and F_v features in PSII chlorophyll fluorescence induction[J]. Photochemistry and Photobiology, 2019, 95(6): 1495-1503.
- [10] Singh H, Kumar D, Soni V. Performance of chlorophyll a fluorescence parameters in *Lemna minor* under heavy metal stress induced by various concentration of copper[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 1-14.
- [11] 俞华先, 田春艳, 经艳芬, 等. 大茎野生种 57NG208 血缘甘蔗群体 F_0 种质叶片的叶绿素荧光特征[J]. 西南农业学报, 2023, 36(3): 515-521.
Yu H X, Tian C Y, Jing Y F, et al. Chlorophyll fluorescence characteristics on leaves of germplasm of *Saccharum robustum* 57NG208 F_0 generation[J]. Journal of Southwest Agriculture, 2023, 36(3): 515-521.
- [12] Burns J K, Sagaram M. Leaf chlorophyll fluorescence parameters and huanglongbing[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2009, 134(2): 194-201.
- [13] Ranjbarfordoei A, Samson R, van Damme P. Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller) D. Webb] in response to salinity stress induced by NaCl[J]. Photosynthetica, 2006, 44(4): 513-522.
- [14] Jafarinia M, Shariati M. Effects of salt stress on photosystem ii of canola plant (*Barassicanapus*, L.) probing by chlorophyll a fluorescence measurements[J]. Iranian Journal of Science and Technology Transaction A-Science, 2012, 1: 71-76.
- [15] Streeter M J V, Colgan C, Cobo C C, et al. Laser wakefield accelerator modelling with variational neural networks[J]. High Power Laser Science and Engineering, 2023, 11(9): e9.
- [16] Goodman J, King M, Dolier E J, et al. Optimisation and control of synchrotron emission in ultraintense laser-solid interactions using machine learning[J]. High Power Laser Science and Engineering, 2024, 12(1): 01000e.
- [17] 王忠东, 张云刚, 张亮敬, 等. 基于深度学习的石油污染物三维荧光光谱识别技术研究[J]. 激光与光电子学进展, 2023, 60(15): 1530001.
Wang Z D, Zhang Y G, Zhang L J, et al. Research on three-dimensional fluorescence spectrum recognition technology of petroleum pollutants based on deep learning[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2023, 60(15): 1530001.
- [18] Belkoura L. Identifiability of systems described by convolution equations[J]. Automatica, 2005, 41(3): 505-512.
- [19] He Q F, Daqaq M F. Electric load optimization of a nonlinear mono-stable duffing harvester excited by white noise[J]. Meccanica, 2016, 51(5): 1027-1039.
- [20] Ge S C, Deng M, Chen K, et al. Broadband signal generator for the approximation of a magnetotelluric source for indoor testing[J]. Journal of Geophysics and Engineering, 2016, 13(4): 612-621.
- [21] Noël J P, Renson L, Grappasonni C, et al. Identification of nonlinear normal modes of engineering structures under broadband forcing[J]. Mechanical Systems and Signal Processing, 2016, 74: 95-110.