**doi**:10.3788/gzxb20184706.0630001

# 激光诱导植物叶绿素荧光寿命及光谱特性分析

# 万文博,苏俊宏

(西安工业大学光电工程学院,西安710021)

摘 要:传统荧光光谱分析法虽能用于评估植物生理状况,但在植物遥感探测中该方法具有抗干扰性弱、待测数据量大的缺陷.针对此问题,提出一种荧光寿命成像技术,将植物荧光寿命及光谱信息结合, 分析植物内在生理信息,实现了远距离、大范围精确测量植物生理状况.采用时间分辨测量法,用连续激 光脉冲照射植物产生大量相同的荧光信号,同时不断改变探测器的启动延迟时间,得到完整的荧光信 号,用解卷积法反演植物荧光寿命.对活体法国冬青植株的光谱信息与荧光寿命特性进行了研究,结果 显示植物荧光寿命与叶绿素含量成线性关系,并且植物叶绿素含量在 0.03~0.06 mg/cm<sup>2</sup>这一特定范 围,线性相关系数高达 0.9051,比荧光光谱能更精确地反映植物叶绿素含量.

# Laser-induced Plant Chlorophyll Fluorescence Lifetime and Spectral Properties Analysis

WAN Wen-bo, SU Jun-hong

(School of Optoelectronic Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an 710021, China)

Abstract: Although the traditional fluorescence spectroscopy method can be used to evaluate the physiological status of plants, there are some measured defects, such as weak anti-jamming, large amount of data in plant remote sensing detection. Aiming at this matter, a fluorescence lifetime imaging technique is presented. The plant fluorescence lifetime and spectral information are combined to analyze the plant physiological information, and a wide spread of plant physiological status can be measured accurately. The many same fluorescence signal can be produced, while the plant is irradiated by continuous laser pulse in the time resolution measurement method. At the same time, a complete fluorescence life can be retrieved by deconvolution arithmetic. The spectral information and fluorescence lifetime of living Viburnum awabuki plants was studied. Then, the results show that the plant fluorescence lifetime is linear with chlorophyll concentration. The linear correlation coefficient reaches into 0.9051 in specific range of  $0.03 \sim 0.06 \text{ mg/cm}^2$ , and plant fluorescence lifetime is a better description of chlorophyll concentration than the fluorescence spectroscopy in the range.

**Key words:** Spectroscopy; Laser-induced fluorescence; Time resolution measurement; Fluorescence lifetime imaging; Fluorescence spectrum; Fluorescence LiDAR

OCIS Codes: 300.0300; 140.3440; 120.0120; 110.6915; 070.4790; 280.3640

# 0 引言

荧光激光雷达作为一种新型植物遥感技术已成为当前国际遥感领域的一个研究热点,2011 年美国国家 航空航天局(National Aeronautics and Space Administration, NASA)与日本温室气体探测卫星光谱小组 合作绘制出了人类历史上首幅地球陆生植物荧光光谱分布地图<sup>[1]</sup>.传统的荧光光谱分析法虽能够方便、准确

收稿日期:2017-12-08;录用日期:2018-04-02

基金项目:国家自然科学基金(No.61378050),陕西省教育厅重点实验室科研计划(No.17JS051),陕西省自然科学基础研究计划(No. 2016JZ025)和西安工业大学光电工程学院院长基金(No.16GDYJZ03)资助

**第一作者:**万文博(1983-),男,讲师,博士后,主要研究方向为激光雷达技术. Email:155216513@qq.com

导师(通讯作者):苏俊宏(1963-),男,教授,博士,主要研究方向为光电测试技术. Email:sujunhong@xatu.edu.cn

地分析植物的生理状况,但荧光光谱信息实际由很多不同波长的荧光强度信号构成,而植物荧光强度又容易 受背景光及探测器摆放位置等外界因素的干扰<sup>[2-3]</sup>.此外,植物荧光光谱又是由许多波段的荧光强度组成 的,因此这就导致探测器在实际复杂环境中所测荧光光谱信息不能准确地反映植物发射荧光的能力,从而也 就很难反映植物的真实生理状况.另外采用光谱扫描仪采集到的光谱不能反映植物荧光的瞬间状态,难以实 现原位表征,若改用许多光电倍增管同时接收不同波段的植物荧光强度信号,再将这些强度信号按其波长顺 序排列起来绘制荧光光谱,虽可实现荧光光谱原位表征,但这样的系统过于复杂,且待测数据量大,很难用于 遥感监测<sup>[4]</sup>.

植物荧光寿命反映荧光的衰减时间,不受环境光、激发光及荧光散射角度等外界因素的干扰;并且在利 用植物荧光寿命分析植物生理状态时,仅需两个波段的荧光寿命即可评估植物的生理状况,因此植物荧光寿 命分析法还具备测量数据量小的优点.激光诱导植物荧光寿命测量技术是一种以植物光能合成作用机制为 研究基础,利用植物荧光信号为探针,分析植物内在生理信息的新型植物活体检测术<sup>[5-7]</sup>.因为激光本身具有 强度高、发散角小、传播距离远等优点,所以这项技术能够实现远距离、大范围植物叶绿素荧光的遥感探测. 也正是如此,激光诱导叶绿素荧光探测技术成为当前国际环境监测领域的一个研究热点<sup>[8-9]</sup>.植物荧光寿命 成像技术通常利用紫光激光作为激发光源.在激光器出口处对激光扩束,再使其照射活体植物,可使激光在 不损伤植物组织的前提下激发植物叶绿素分子产生植物荧光,同时利用增强型电荷耦合器件(Intensified Charge-Coupled Device, ICCD)远距离连续采集植物产生荧光光子信号.再将 ICCD 获取的荧光数据,存储 到计算机,经数据处理,即可绘制被测活体植物的荧光寿命分布图谱<sup>[10-12]</sup>.

植物荧光光谱数据量大,反映植物生理信息多,但不适合遥感探测;而植物荧光寿命更加适合遥感探测, 但植物荧光寿命反映植物生理信息有限.若能在实验室中获取植物光谱信息与荧光寿命之间的对应关系,构 建植物光谱信息、荧光寿命与植物生理信息的关系模型.即可通过遥感探测任意植物的荧光寿命,再利用植 物生理的关系模型分析、评估被测植物的内在生理信息.本文尝试将植物荧光寿命分析法与植物荧光光谱分 析法结合,探究植物荧光寿命、光谱信息与植物内在生理信息之间的关系,以期构建植物荧光寿命、光谱信息 与植物生理信息的关系模型,最终实现通过遥感探测植物荧光寿命,评估植物详细生理信息的目的.未来该 技术将用于植物荧光激光雷达,以实现对地球陆地不同种类植物详细生理状况的实时监测.

### 1 植物荧光寿命成像技术原理

### 1.1 荧光寿命测量原理

利用扩束后的激光照射活体植物,激发其产生荧光,并利用 ICCD 采集荧光图像.ICCD 采集的荧光图像 单个像素点的光强 *I*(*t*)为荧光衰减函数 *g*(*t*)、激光脉冲函数 Las(*t*)与仪器响应函数 Irf(*t*)的卷积,即

$$I(t) = g(t) \otimes \text{Las}(t) \otimes \text{Irf}(t)$$
(1)

如果用不产生荧光的物质(如高纯度的石英玻璃)反射激光信号,ICCD 实际采集到的反射激光信号应为 Las(t) ③ Irf(t)<sup>[13]</sup>.测量植物荧光寿命时,每次用 ICCD 采集的荧光信号 *I*(t)对 Las(t) ③ Irf(t) 做解卷积处理,可得 *g*(t),再根据式(2)就能反演出植物叶绿素的荧光寿命.

$$g(t) = A \cdot \exp(-t/\tau) \tag{2}$$

式中 A 为初始荧光强度, r 表示被测植物的荧光寿命.植物叶绿素荧光寿命与植物生理特性关系为

$$\tau = 1/(R_{nr} + R_r) \tag{3}$$

式中 R<sub>n</sub><sub>r</sub>表示被测植物光合作用的速率, R<sub>r</sub>为其发射荧光的速率<sup>[14]</sup>.

#### 1.2 植物荧光寿命成像技术

ICCD采集的一组连续植物荧光强度图像被称为连续荧光图像数据(Continuous Fluorescence Image Data, CFID).CFID中的每张光强分布图像实际是许多组荧光信号在同一时刻的荧光强度分布图,而整个 CFID相当于由大量时间通道组成的3维像素点阵列,如图1(a)所示.CFID的单个像素点相当于一个时间 通道,每个时间通道记录一组植物荧光信号的强度数据,如图1(b)所示.获取植物 CFID 后,分别提取各个时 间通道内的荧光数据,分别对 Las(t) ②Irf(t) 解卷积,得到各时间通道内荧光的衰减函数,再根据式(1)即可 反演出 CFID 中所有荧光信号的荧光寿命,绘制该区域植物的荧光寿命分布图谱.



Fig.1 The distribution of plant fluorescence signals in every time channel from CFID

由于 CFID 量很大,存储时间较长,故 ICCD 每次拍摄只能采集到植物某一区域产生的荧光信号在一个时刻的分布图.因此,必须用连续激光脉冲不断照射被测区域,激发被测区域连续产生很多相同的荧光信号;同时使这些激光脉冲在照射被测区域前触发 ICCD 启动,并利用 ICCD 的控制软件控制 ICCD 的启动延迟时间不断增加,这样就能够获得植物被测区域产生的荧光信号在不同时刻的强度分布图谱.所用 ICCD 的"曝光时间"必须远小于被测植物的荧光信号的持续时间.

## 2 植物荧光寿命成像系统设计

植物荧光寿命成像系统原理见图 2,光源采用 镭宝 Dawa-350 型激光器,参数见表 1.首先利用高 反分光镜剔除入射激光光束中的基频和二倍频激 光,经三次反射再用焦距 60 mm 的凹透镜对其扩 束,使激光均匀的照射在被测植物组织上;同时在高 反分光镜后放置一块激光吸收盒用于吸收剔除的基 频和二倍频激光.用光电二极管 (Photo-Diode, PD) 接收激光吸收盒附近微弱的激光散射光以触发 ICCD 启动拍摄.由于 740 nm 波长的叶绿素荧光受 植物生理状态影响较大,所以在 ICCD 镜头前安装 中心波长 740 nm、带宽 10 nm 的窄带滤光片,系统 即可采集 740 nm 的植物叶绿素荧光.若将被测植物 更换为一块高纯度的石英玻璃,并用光学衰减片替 换原系统中的窄带滤光,再启动激光器,此时 ICCD 采集到的信号就可表示式(1)中的 Las(t)  $\otimes$  Irf(t). 将 ICCD 采集到的这一系列数据存储到计算机,再 经数据处理,就能够获取植物被测区域的荧光寿命 分布图谱.

利用图 2 中的 PD 触发 ICCD 启动拍摄需要约 50 ns 的启动延迟时间,而植物荧光信号的持续时间 通常不会超过 30 ns.因此,如果用高反分光镜分出 的 355 nm 激光直接激发植物产生荧光,那么 ICCD





表 1 镭宝 Dawa-350 型激光器参数列表 Table 1 The list of Beamtech Dawa-350 laser parameters

Parameter	Description/Value
Wavelength	355 nm
Energy per pulse	50 mJ
Pulse repetition rate	10 Hz
Pulse width	$\leqslant$ 7 ns
Spot diameter	7 mm
Divergence angle	$\leqslant 1 \text{ mrad}$

将无法采集到植物受激产生的荧光信号.因此要对入射激光做三次反射使其传播一定距离(图 2 中  $R_1$ 、 $R_2$ 、  $R_3$ 的总距离取 15.10 m,这个距离约等于 50 ns 光线在空气中传播的距离)后就会产生一段延迟时间,再照植

物恰好可补偿 ICCD 的 50 ns 启动延迟时间.系统采用美国普林斯顿仪器公司生产的 PIMAX-4 型 ICCD,设置 ICCD 在连拍模式下的"曝光时间"为 0.02 ns,连续拍摄中每次 ICCD 的启动延迟时间的增加量为0.02 ns, 拍摄次数为 1 000 次,保证每次连拍刚好可获取到一组完整的 CFID.

# 3 植物荧光寿命及光谱特性分析

图 3 为生长情况良好的法国冬青植株的荧光光谱图,其光谱在约 680 nm(左峰)与 740 nm(右峰)波长 处各存在一个波峰,它们分别是由光系统 II (Photo System II, PS II) 和光系统 I (Photo System I, PS I)中 的叶绿素分子产生,而两波峰交汇处(约 700 nm 波长)存在一个波谷.如果被测植物的生长情况改变,其内部 生理结构会随之发生改变.因此,PS II 和 PS I 的荧光发射速率也随之改变,从而整条植物荧光光谱会以两波 峰为支点发生变化<sup>[15-16]</sup>.由于 PS I 结构稳定性较差,所以植物生理状况变化时,其发射荧光的能力变化更 大,那么右峰荧光信号的变化也更为明显.

由于叶绿素含量是反映植物内在生理信息的重要指标,而右峰处的荧光信号随植物生理状况的变化更为明显.因此,选择重点研究 740 nm 波长(右峰)荧光与植物叶绿素浓度的对应关系.将大量不同颜色的法国 冬青叶片栽剪成直径 3 cm 的圆形样品.分别获取这批样品的荧光光谱及 740 nm 波长的荧光寿命后,再将这 批各样品剪成~2 mm 宽的条状,放入 5 mL 用 90 %的乙醇(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)与 75 %的丙酮(CH<sub>3</sub>COOH<sub>3</sub>)以 1:2的比例配制的混合溶液内,提取法国冬青叶片中的叶绿素.采用上海谱元仪器有限公司 Alpha-1506 型 分光光度计测量各份提取液中叶绿素的含量,分别得到植物荧光寿命、光谱信息与植物叶绿素含量之间的对 应关系.

利用图 2 所示的荧光寿命成像系统获取每个圆形叶片的荧光寿命分布后,计算出每个叶片的平均荧光 寿命值,得到法国冬青叶片荧光寿命与其单位面积叶绿素含量的对应关系,如图 4 所示.图中拟合直线的线 性相关系数 r=0.632 7.由于植物荧光寿命不但受叶绿素含量的影响,而且与植物内在生理信息也存在复杂 的关联,这就造成植物荧光寿命与其单位面积叶绿素含量线性相关性很弱.



Fig.3 Laser-induced plant fluorescence spectrum



图 4 法国冬青植株叶绿素含量与荧光寿命的线性关系 Fig.4 The linear relationship of chlorophyll concentration and chlorophyll fluorescence lifetime for Viburnum awabuki plants leaves

若选取大量即将枯萎的法国冬青叶片重复以上实验,可得到叶绿素含量分布于 0~0.015 mg/cm<sup>2</sup>时,法 国冬青叶片的荧光寿命与其单位面积叶绿素含量的对应关系,如图 5 所示.由图 5 中的植物荧光寿命与单位 面积叶绿素含量之间的线性关系曲线可看出,当法国冬青叶片的叶绿素含量处于 0.003~0.015 mg/cm<sup>2</sup>时, 其线性相关系数 r=0.670 7.叶绿素含量处于这一范围的叶片都已基本枯黄,这些叶片的叶绿素含量极少, 且大部分细胞都已坏死,而少数存活的细胞也都是生理状态比较差的细胞.这类叶片细胞的生理状态虽然都 比较差,但是它们的胁迫程度又各不相同.因此,这批叶片的叶绿素发射荧光的能力虽然都比较弱,但是依然 差异较大,这就造成了植物荧光寿命与其叶绿素含量关系曲线的线性相关度依然不高.

在大量法国冬青植株中挑选出若干生理状态极佳墨绿色的叶片,再次重复以上实验,得到叶绿素含量大于 0.03 mg/cm<sup>2</sup>时,法国冬青叶片荧光寿命与其单位面积叶绿素含量之间的对应关系,如图 6 所示.由图 6 中 法国冬青叶片的荧光寿命与其单位面积叶绿素含量之间的线性拟合曲线可发现,当法国冬青叶片的叶绿素 含量大于 0.03 mg/cm<sup>2</sup>时,法国冬青叶片的叶绿素荧光寿命与其叶绿素含量不但是成线性关系的,且拟合曲 线的线性相关性较高,其线性相关系数 r=0.905 1.叶绿素含量处于这一范围的法国冬青叶片通常吸收养分 充足,不但其叶绿素含量比较高,而且这批法国冬青叶片的植物细胞生理状态也都比较良好,都趋于一个相 同的极限水平.植物发射叶绿素荧光的能力不单与其叶绿素含量有关,而且受植物细胞生理状态的制约,而 这批法国冬青叶片生理状态又比较接近,所以其细胞生理状态对叶绿素荧光寿命的影响也都比较接近,那么 这批法国冬青叶片的叶绿素荧光寿命的差异就主要取决于其叶绿素含量.因此,图 6 中植物荧光寿命与其单 位面积叶绿素含量之间的线性相关性就比较强.





图 6 墨绿色法国冬青植株叶片叶绿素含量与荧光寿命 的线性关系

Fig.5 The linear relationship of chlorophyll concentration and fluorescence lifetime for the withered and yellow Viburnum awabuki plant leaves

Fig.6 The linear relationship of chlorophyll concentration and fluorescence lifetime for the invisible green Viburnum awabuki plant leaves

在分析荧光光谱信息时,如测量整条荧光光谱,不但数据量冗长,而且测量系统复杂不利于遥感探测,因此选择以荧光光谱两波峰处强度的比值来反映荧光光谱信息的变化状.根据各叶片的荧光光谱分别可得其 光谱右峰波峰与波谷的强度比,以及光谱右峰与左峰强度比,从而可绘制这两项比值与植物叶绿素含量的变 化关系曲线,分别如图 7、图 8 所示.根据两图数据的变化趋势可见:随植物叶绿素含量增加,植物产生 740 nm波长荧光的相对强度具有逐渐增加的趋势,但叶绿素含量达到一定浓度,740 nm 波长荧光的相对强 度与叶绿素含量将不再满足线性关系.



- 图 7 植物荧光光谱右峰与波谷强度比随植物叶绿素浓度 的变化关系
- Fig.7 The relationship between the intensity ratio of the plant fluorescence spectra right peak and trough with the plant chlorophyll concentration



图 8 植物荧光光谱右峰与左峰强度比随植物叶绿素浓度 的变化关系



综合分析表明:植物荧光寿命与其叶绿素含量成线性关系,并且植物荧光寿命与其叶绿素含量在较大范 围内保持正比关系,但植物荧光寿命受植物个体差异因素影响较大,导致其与叶绿素含量之间关系的线性度 较差;而植物荧光光谱信息与其叶绿素含量的线性度较好,但植物荧光光谱信息与叶绿素含量能成正比关系 的范围较小.因此,单方面用荧光寿命或荧光光谱信息很难高精度、大范围地反映植物叶绿素的含量,而将两 种参数结合反映植物叶绿素含量是实现植物详细内在生理信息实时监测的唯一途径.

# 4 结论

利用激光诱导植物荧光寿命成像系统实现了对法国冬青植株荧光寿命分布的远距离测量,并得到了法 国冬青的叶绿素含量与其植物荧光特性(光谱信息、荧光寿命)的关系模型.结果表明:植物荧光寿命与植物 叶绿素含量成线性关系,并且在一定叶绿素浓度范围内线性相关度优于光谱信息与植物叶绿素含量的线性 相关度.传统的植物荧光分析技术通常利用单一荧光参数评估植物的生理状况,但是研究发现植物生理状况 是一个复杂多变体系,很难利用某一单一参数实现植物详细生理状况的评估.而将植物荧光寿命与光谱信息 结合,可更准确地评估植物生理状况.这项技术可应用于荧光激光雷达,以分析被测植物的荧光数据,从而实 现远距离、大范围遥感监测植物生理状况的目标.未来将与植物学家、生物物理学家合作,对多种植物的荧光 信息与其各项生理参数的关系进行详细研究,以期构建植物荧光信息、植物详细内在生理信息以及叶绿素含 量之间的关系模型,为实现远距离遥感监测植物详细生理信息奠定基础.

### 参考文献

- [1] SAITO Y, TAKANO K, KOBAYASHI F, et al. Development of a UV laser-induced fluorescence lidar for monitoring blue-green algae in Lake Suwa[J]. Applied Optics, 2014, 53(30): 7030-7036.
- [2] KOTZAGIANNI M, COURIS S. Femtosecond laser induced breakdown spectroscopy of air-methane mixtures [J]. Chemical Physics Letters, 2013, 561: 36-41.
- [3] WITTE K, STREECK C, MANTOUVALOU J, et al. Magnesium K-Edge NEXAFS spectroscopy of chlorophyll alpha in solution[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2016, **120**(45): 11619-11627.
- [4] SMIS A, MURGUZUR F J A, STRUYF E, *et al.* Determination of plant silicon content with near infrared reflectance spectroscopy[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 496.
- [5] CAMPOS-DELGADO D U, NAVARRO O G, ARCE-SANTANA E R, et al. Extended output phasor representation of multi-spectral fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6(6): 2088-2105.
- [6] NAJAFI M, ZAZUBOVICH V. Monte carlo modeling of spectral diffusion employing multiwell protein energy landscapes: application to pigment-protein complexes involved in photosynthesis[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2015, 119(25): 7911-7921.
- [7] KUMAR A T N. Fluorescence lifetime detection in turbid media using spatial frequency domain filtering of time domain measurements[J]. Optics Letters, 2013, 38(9): 1440-1442.
- [8] ERGIN F G, WATZ B B, ERGLIS K, et al. Time-resolved velocity measurements in a magnetic micromixer [J]. Experimental Thermal and Fluid Science, 2015, 67: 6-13.
- [9] YEH Y C, YUAN C T, KANG C C, *et al.* Influences of light intensity on fluorescence lifetime of nanorods and quantum dots[J]. *Applied Physics Letters*, 2008, **93**(22): 223110-223116.
- [10] DOBRANSZKI J, MENDLER-DRIENYOVSZKI N. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 2014, **171**(16): 1472-1478.
- [11] DUAN Jing-bo, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, *et al.* Study on the dark adaptation time of algaes strrssed by Cu<sup>2+</sup> using chlorophyll fluorescence measurements[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2014, **43**(2): 0217002.
  段静波,刘文清,张玉钧,等. 叶绿素荧光技术对受 Cu<sup>2+</sup> 胁迫藻类暗适应时间的研究[J]. 光子学报, 2014, **43**(2): 0217002.
- [12] LEWIS N H C, FLEMING G R. Two-dimensional electronic-vibrational spectroscopy of chlorophyll a and b[J]. Journal of Physical Chemistry Letters, 2016, 7(5): 831-837.
- [13] EVA F, Martin K. Mean fluorescence lifetime and its error[J]. Journal of Luminescence, 2012, 132(8): 2059-2064.
- [14] CHAN J C K, DIEBOLD E D, BUCKLEY B W, et al. Digitally synthesized beat frequency-multiplexed fluorescence lifetime spectroscopy[J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(12): 4428-4436.
- [15] GRANUM E, PEREZ-BUENO M L, CALDERON C E, et al. Metabolic responses of avocado plants to stress induced by Rosellinia necatrix analysed by fluorescence and thermal imaging[J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 142(3): 625-632.
- [16] PTUSHENKO V V, PTUSHENKO O S, TIKHONOV A N. Chlorophyll fluorescence induction, chlorophyll content, and chromaticity characteristics of leaves as indicators of photosynthetic apparatus senescence in arboreous plants[J]. *Biochemistry-Moscow*, 2014, 79(3): 260-272.

Foundation item: The National Natural Science Foundation of China (No.61378050), Key Laboratory Scientific Research Program of Shaanxi Provincial Education Department (No. 17JS051), Basic Science Research Program of Shaanxi Province (No. 2016JZ025), and Dean Fund Program from School of Optoelectronic Engineering, Xi'an Technological University (No. 16GDYJZ03)

引用格式:WAN Wen-bo, SU Jun-hong. Laser-induced Plant Chlorophyll Fluorescence Lifetime and Spectral Properties Analysis[J]. Acta Photonica Sinica, 2018, 47(6): 0630001

万文博,苏俊宏.激光诱导植物叶绿素荧光寿命及光谱特性分析[J].光子学报,2018,47(6):0630001