

# ПАРАДОКСЫ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЗЕЛЕННЫХ КЛЕТОК И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

А.Будаговский, ВНИИГиСПР им. И.В.Мичурина, Budagovsky@mail.ru  
 О.Будаговская ВНИИС им. И.В.Мичурина  
 И.Будаговский, ФИАН им. П.Н.Лебедева

Разработан метод диагностики функционального состояния растений по измерению амплитудно-фазовых характеристик рассеянного на растительной ткани квазимонохроматического излучения зондирующего лазерного пучка. Метод позволяет оценить состояние и не фотосинтезирующих тканей растений по степени упорядоченности их микроструктурной организации.

Существует большое количество оптических методов, позволяющих исследовать растительные организмы. Так, например, по коэффициенту пропускания или отражения квазимонохроматического пучка света можно судить о концентрации хлорофилла, каротиноидов и антоцианов в листьях; спектральные характеристики плодов используют для оценки зрелости и качества; лазерное сканирование агроценозов позволяет определить их продуктивность [1–4]. Полагают, что при взаимодействии зондирующего пучка с растительной тканью ее оптические свойства остаются стабильными. А если какие-либо изменения и происходят, то достаточно медленно, и они становятся заметными спустя время, значительно превосходящее длительность измерений. Относительное постоянство оптических свойств растений стало интуитивной аксиомой и легло в основу многих методов исследования их функционального (физиологического) состояния. Но реальная ситуация оказалась значительно сложнее.

Зондирующий пучок квазимонохроматического, в частности, лазерного излучения, претерпевает сложные превращения при взаимодействии с растительной тканью. Если в ней есть клетки, содержащие зеленый пигмент хлорофилл, то наблюдаемые эф-

фекты особенно интересны и носят, казалось бы, парадоксальный характер. Заключается это в сравнительно быстром спаде интенсивности и росте когерентности рассеянного зондирующего пучка в процессе измерений (рис.1). Уже в первые несколько секунд изменение оптических показателей как в режиме пропускания, так и отражения света (рис.2) достигает десятков процентов. Это легко регистрируется амплитудно-фазовым детектором с неселективным фотоприемником [5].

Рассмотрим, какие именно превращения испытывает лазерный луч в фотосинтезирующей ткани растений и как это можно использовать для практических целей. Пусть на живой зеленый лист падает квазимонохроматический пучок света интенсивностью  $I_0$  и длиной волны  $\lambda_0 \pm \Delta\lambda_0$ . Из условия монохроматичности следует:  $\Delta\lambda_0 \ll \lambda_0$ . Часть света ( $RI_0$ , где  $R$  – коэффициент отражения) отразится на границе раздела сред. Другая часть ( $AI_0$ , где  $A$  – коэффициент поглощения) будет поглощена листом. Оставшаяся часть зондирующего потока ( $TI_0$ , где  $T$  – коэффициент пропускания), претерпев рассеяние, выйдет за пределы листовой пластинки.

Поглощенный зелеными тканями растения свет час-

точно диссипирует в тепло, частично расходуется на фотохимические реакции фотосинтеза, а частично высвечивается в виде хлорофиллфлуоресценции (ХФ). Ее спектр лежит в области 660–800 нм, с максимумами в районе 690 и 740 нм. В результате возникает комбинированный оптический сигнал, содержащий два типа излучений различной природы: рассеянный зондирующий пучок и индуцированная им флуоресценция хлорофилла.

К первому типу относятся отраженный  $RI_0$  и прошедший  $TI_0$  пучки света. Они будут иметь тот же спектральный состав, что и зондирующий поток, однако их статистическая упорядоченность (когерентность) изменится.

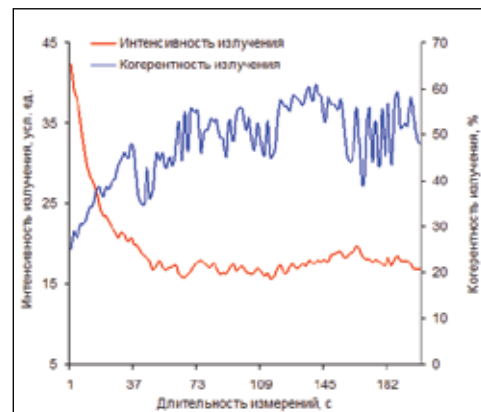


Рис.1. Зависимость от длительности измерений интенсивности и когерентности зондирующего излучения, рассеянного листовой пластинкой цисуса ромболистного ( $\lambda=650$  нм,  $P=3$  мВт)

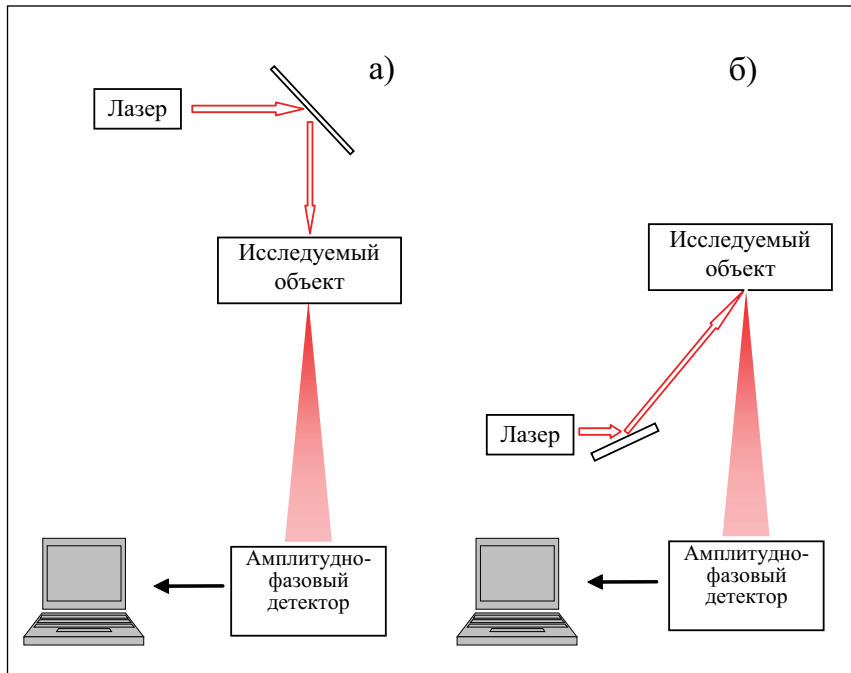


Рис.2. Функциональные схемы измерений биологических объектов: а – в проходящем свете, б – в отраженном свете

Это связано с оптической гетерогенностью растительной ткани и упругим рассеянием света на ее микронеоднородностях. В результате происходит уширение углового спектра лазерного пучка и снижение его радиуса корреляции. Речь идет о корреляции фаз в фотонном коллективе, радиус корреляции является характеристическим значением пространственной поперечной корреляционной функции световой волны, описывающей ее пространственную когерентность. Ткань растения в этом случае представляется в виде стохастического фазового экрана, параметры которого связаны с корреляционной функцией рассеянного излучения:

$$\Gamma(s) = 1 - \frac{s}{a} + \frac{s}{a} \int_{-\infty}^{+\infty} \omega(h) \exp(i2\pi sh / \lambda a) dh. \quad (1)$$

Фазовый экран – среда, в которой происходит изменение фаз фотонного коллектива, в стохастическом фазовом экране оптические неоднородности располагаются произвольно, не упорядочены, т.е. в определенной мере стохастизированы. В выражении (1) для  $\Gamma(s)$  – комплексной степе-

ни пространственной когерентности – принято, что  $s$  – разность хода в поперечном сечении зондирующего пучка;  $a$  – ширина оптических неоднородностей;  $\omega(h)$  – функция распределения неоднородностей фазового экрана по высоте  $h$ ;  $\lambda$  – длина волны зондирующего излучения. Как видно из уравнения (1), степень когерентности рассеянного излучения определяется параметрами неоднородностей ткани и может служить мерой ее микроструктурной организации.

Амплитудные характеристики зондирующего излучения также представляют определенный интерес для анализа растений. Взаимодействуя с тканью, световая волна уменьшает свою интенсивность, что для случая однократного рассеяния может быть описано следующим выражением [6]:

$$I = I_0 e^{(-N_{abs} C_{abs} l)} e^{(-N_{sca} C_{sca} l)}, \quad (2)$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность излучения до и после взаимодействия с объектом;  $l$  – длина оптического пути,  $N_{abs}$  и  $C_{abs}$  – концентрация и эффективное сечение поглощающих частиц;  $N_{sca}$  и  $C_{sca}$  – концентрация и эффективное сечение рассеивающих частиц.

Измерение амплитудно-фазовых характеристик рассеянного зондирующего пучка позволя-

ет дать количественную оценку функционального состояния растений. Такой метод диагностики получил название ЛАМ: лазерный анализ микроструктуры (тканей). Проведенные исследования показали, что действие различных дестабилизирующих факторов (физических, химических, биотических), нарушающих нормальное функционирование организма, обнаруживается по снижению статистической упорядоченности рассеянного излучения и изменению его интенсивности [7, 8]. Типичной иллюстрацией служит динамика патогенеза (заражения) растительной ткани (рис.3). В здоровой ткани (точка 1) когерентный пучок сильно поглощался, но сохранял значительную часть своей пространственной когерентности ( $I \approx 109$ ;  $G \approx 39\%$ )\*. Учитывая выбранную длину волны (632,8 нм), основным пигментом, поглощающим кванты света, можно считать хлорофилл. В латентной фазе развития инфекции (точка 2) концентрация хлорофилла

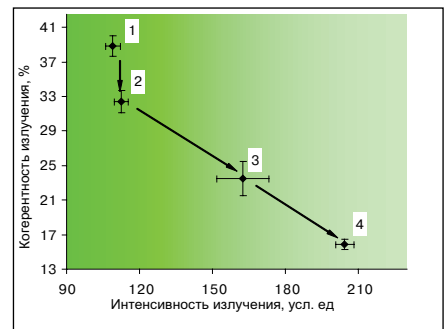


Рис.3. Параметры лазерного излучения (632,8 нм), рассеянного листовыми пластинками шпината при различной степени поражения патогеном *Perozpora* sp.

оставалась неизменной, но стало заметно нарушение микроструктуры ткани. Пространственная когерентность рассеянного зондирующего пучка снизилась до 32%. Появление видимых симптомов заболевания (точка 3) сопровождалось дальнейшей стохастизацией (уменьшением когерентности) светового потока ( $G \approx 23\%$ ) на фоне роста его интенсивности ( $I \approx 163$ ). Причина, вероятно, связана с нарушением структуры ткани и началом разрушения хлорофиллбелкового

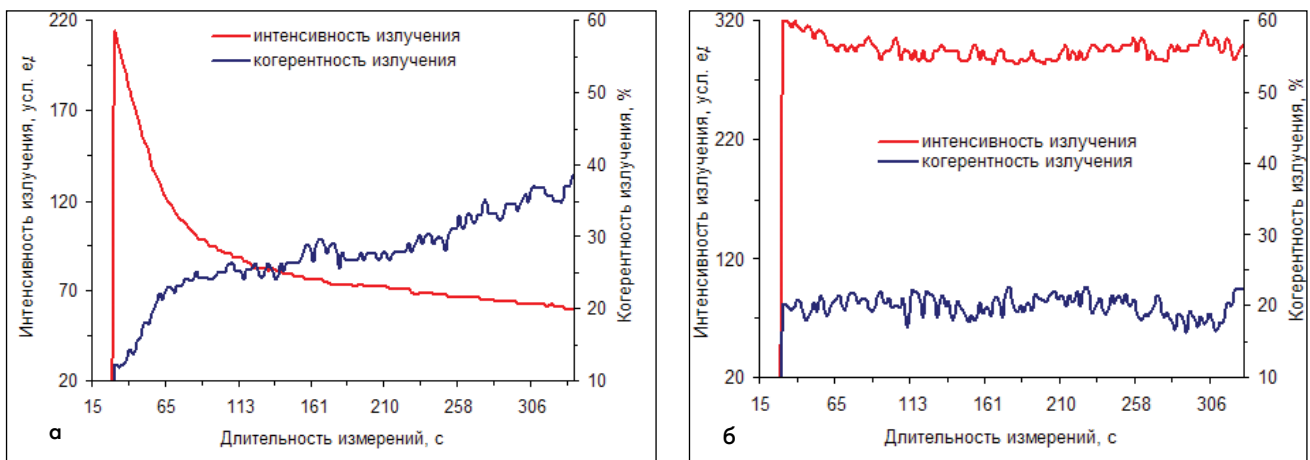


Рис. 4. Влияние функционального состояния листовых пластинок цисуса ромболистного на динамику амплитудно-фазовых характеристик рассеянного зондирующего пучка (длина волны 650 нм): а – нормальный (функционально активный) лист; б – лист с признаками хлороза (низкая функциональная активность)

комплекса. При сильном развитии инфекции (точка 4) амплитудно-фазовые характеристики рассеянного зондирующего пучка претерпели двукратное изменение ( $I \approx 204$ ;  $G \approx 16\%$ ).

Описанные процессы проходили сравнительно медленно, в течение десятков часов. Их можно считать квазистационарными. Однако свет способен вызвать и более динамичную конверсию (от лат. *conversio* изменение, превращение) оптических свойств растительной ткани, которая протекает за несколько десятков или даже единиц минут. Обусловлено это изменением формы, размеров и положения хлоропластов в клетке, движением цитоплазмы, а также фотодеструкцией хлорофилла [9, 10]. То есть, амплитудно-фазовые характеристики рассеянного растительной тканью света следует считать не постоянными, а медленно меняющимися и учитывать это при проведении измерений.

Вторым типом излучения, содержащегося в регистрируемом сигнале, является хлорофиллфлуоресценция. Она обладает низкой когерентностью вследствие отсутствия корреляции между элементарными актами испускания фотонов. Ее интенсивность  $F$  зависит от квантового выхода флуоресценции  $\Phi_F$  и числа поглощенных фотонов  $AI_0$ , т.е.

$F = \Phi_F AI_0$ . В этом случае интенсивность света принято представлять в мкмоль фотонов умноженное на  $m^2c^{-1}$ , где моль фотонов равен числу Авогадро. Для возбуждения ХФ целесообразно использовать свет, соответствующий спектральным максимумам поглощения хлорофилла. Например, зондирующее излучение полупроводникового лазера с длиной волны 650 нм поглощается листьями на 85–95% в зависимости от содержания в них зеленого пигмента [11]. У фотосинтезирующих тканей средний квантовый выход флуоресценции составляет 0,01–0,1 [12, 13]. Тогда интенсивность флуоресценции даже с учетом реабсорбции (вторичного поглощения) может достигать 3–5% от величины зондирующего потока  $I_0$ . Вблизи  $\lambda_0=650$  нм коэффициенты пропускания и отражения листьев также составляет единицы процентов [1, 11]. Следовательно, интенсивности рассеянного зондирующего пучка с длиной волны  $\lambda_0$  и хлорофиллфлуоресценции в более длинноволновой области будут приблизительно равными.

Характерной особенностью ХФ является то, что ее квантовый выход зависит от интенсивности, а также длительности воздействия света и может изменяться в широких пределах. При низкой ос-

вещенности, когда практически все реакционные центры фотосистемы открыты, большая часть поглощенных квантов участвует в фотохимическом процессе и ХФ имеет минимальный уровень  $F_0$ . При попадании на лист достаточно яркого (но не повреждающего) света, например, зондирующего пучка, происходит перенасыщение реакционных центров и они перестают выполнять фотосинтетическую функцию (закрываются). Избыток энергии возбуждения расходуется на флуоресценцию, которая достигает своего максимального значения  $F_m$ . Происходит так называемая быстрая фаза индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ). Относительный выход переменной флуоресценции:  $(F_m - F_0)/F_m$  характеризует эффективность первичных процессов фотосинтеза [12, 13]. Длительность переходного периода измеряется долями секунды. За это время интенсивность ХФ может возрасти в несколько раз и значительно превысит величину светового потока рассеянного излучения:  $RI_0$  или  $TI_0$ . Если зондирующий пучок и далее продолжает воздействовать на лист, начинается адаптация фотосинтетического аппарата клеток к интенсивному свету. Реакционные центры постепенно открываются, что приводит к снижению квантового выхода ХФ.

\* В описываемых экспериментах измеряли выраженный в процентах модуль нормированной корреляционной функции первого порядка  $G(s) (\%) = 100 | \Gamma(s) |$  при некотором фиксированном значении  $s$ , интенсивность рассеянного излучения  $I$  дана в условных единицах, соответствующих показаниям прибора.

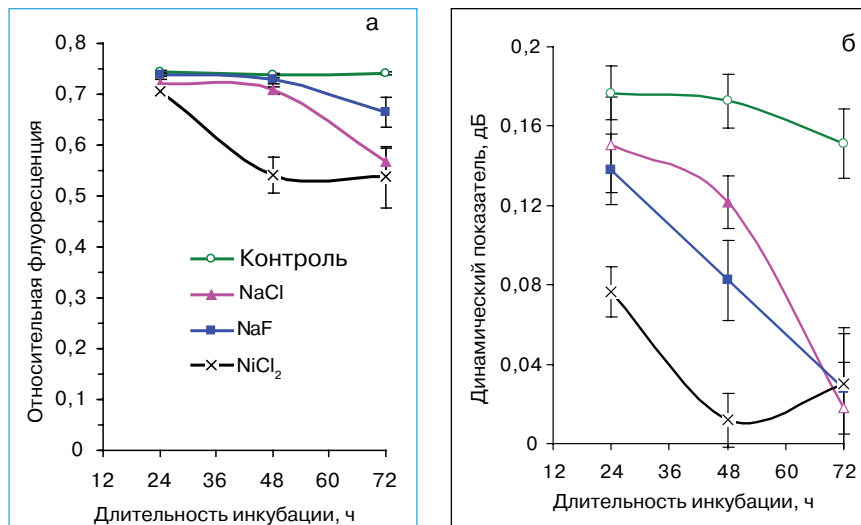


Рис.5. Оценка действия токсичных соединений на высечки листовых пластинок малины: а – методами ПАМ по относительному выходу переменной флуоресценции  $(F_m - F_o) / F_m$ ; б – методом ЛАТ по динамическому показателю b

Это медленная фаза ИФХ, которая продолжается десятки секунд [14].

Определяемая эффектом Каутского [15] (изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла, происходящее под действием достаточно яркого света, отражает работу фотосинте-

тического аппарата клетки) кинетика ИФХ показывает состояние фотосинтетического аппарата клетки и служит важным диагностическим показателем. В то же время она усложняет оценку оптических свойств растительных тканей. Связано это с тем, что фотоприемники (фотодио-

ды, ФЭУ, ССD-камеры), которые обычно используют для измерения оптических потоков, обладают чувствительностью в широком диапазоне длин волн. Без специальных мер они не могут различать зондирующий поток и индуцированную им флуоресценцию хлорофилла. Неселективный фотодетектор регистрирует комбинированный световой сигнал, содержащий два компонента, различающихся по когерентности, спектральному диапазону и скорости изменения своей интенсивности. Именно такая картина представлена на рис.1. Спад интенсивности обусловлен снижением квантового выхода хлорофиллфлуоресценции в медленной фазе ИФХ. Эта же причина вызвала рост когерентности светового потока: в комбинированном сигнале уменьшился стохастический компонент, т.е. ХФ, а когерентный, полученный в результате упругого рассеяния зондирующего пучка, остался без значительных изменений.



## Технические характеристики приборов серии ЛАТ

Параметры	Модель прибора		
	ЛАТ-2К	ЛАТ-3К	ЛАТ-4КМ-Ст
Условия применения	Лабораторные и полевые	Лабораторные и полевые	Лабораторные
Режим измерений	Пропускание света	Пропускание и отражение света	Пропускание света
Количество информативных показателей	3	5	8
Число режимов облучения	2	8	1
Минимальный размер измеряемого объекта, мм	3	5	1
Максимальная толщина измеряемого объекта, мм	15	Не ограничена	35
Потребляемая мощность, Вт	0,35	0,40	0,40
Наличие сменных модулей	Нет	Есть	Есть
Размеры модуля, мм	–	18×23×60	58×70×70
Размеры прибора (без модуля), мм	42×46×138	58×68×120	150×250×400
Масса (без ПК), г	180	450	2100
Гарантийный срок, мес.	12	12	24



Рис.7. Лазерные приборы для функциональной диагностики растений серии ЛАТ

Применение селективных фотоприемников позволяет провести независимую оценку микроструктурной организации ткани и ее фотосинтетической активности. Не меньший интерес представляет и прямое измерение комбинированного сигнала, содержащего когерентный и некогерентный (точнее, низкокогерентный) компоненты. Для экспресс-диагностики растительных организмов могут быть использованы амплитудно-фазовые (интенсивность и когерентность) характеристики такого излучения. Установлено, что чем больше величина и скорость их изменения, тем выше функциональная активность биологического объекта (рис.4). Аналитическое описание кинетических процессов удобно провести посредством аппроксимации рядов экспериментальных данных степенными уравнениями регрессии вида  $G(t); I(t) = At^b$ . Показатель степени  $b$  (динамический показатель) предложен в качестве количественной оценки состояния фотосинтезирующих тканей растений.

Комбинированное и/или независимое использование ЛАМ и ХФ позволило разработать ряд новых способов экспресс-диагностики функционального состояния растительных организмов (восемь патентов России). Они получили общее название ЛАТ: лазерный анализ тканей. Оценка чувствительности ЛАТ проведена в сравнении с широко известным методом импульсной хлорофиллфлуориметрии ПАМ (Pulse Amplitude Modulation) [16] (рис.5).

Различные токсиканты при определенных дозах воздействия снижают как величину перемен-

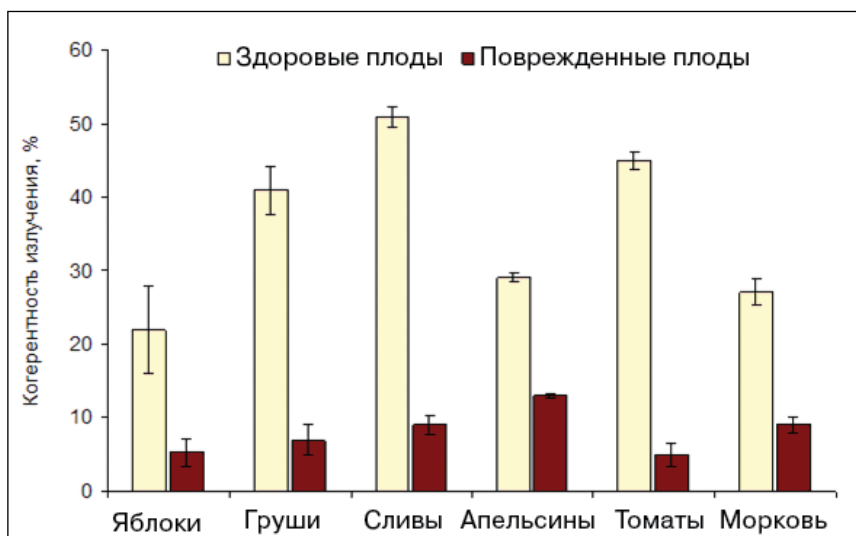


Рис.6. Изменение степени когерентности рассеянного лазерного излучения при повреждении плодов различных сельскохозяйственных культур



Рис.8. Компактный диагностический прибор широкого применения ЛАТ-2К



Рис.9. Универсальный диагностический прибор, способный работать как в режиме пропускания, так и в режиме отражения света ЛАТ-3К

ной флуоресценции, так и скорость изменения фотоиндуцированных процессов в хлоропластах. Но при этом использование комбинированного сигнала, полученного методом ЛАТ, позволяет выявить более тонкие различия в ответной реакции растений и при меньших действующих дозах, чем методом ПАМ (см. рис.5). К тому же с помощью ЛАТ можно оценивать состояние и не фотосинтезирующих тканей растений по степени упорядоченности их микроструктурной организации (рис.6). Таким образом, ЛАТ обладает большей чувствительностью и универсальностью, чем методы, построенные только на измерении хлорофиллфлуоресценции.

Разработанные способы экспресс-диагностики растений прошли испытание в ряде научных центров: Рейнском университете (Германия), ВНИИГиСПР, ВНИИС, ВНИИЦиСК (Россия) и показали свою пригодность для решения широкого круга научных и практических задач, например:

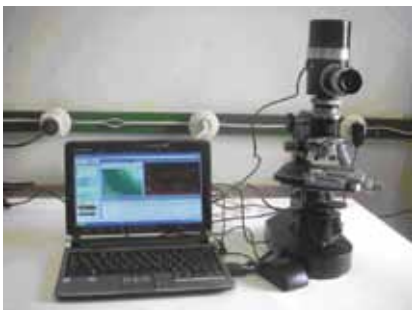
- исследование стрессоустойчивости и адаптивного потенциала растительных организмов;
- экологический мониторинг;
- оценка зрелости и товарного качества плодов и овощей;
- выбор условий хранения сельскохозяйственной продукции в предреализационный период;
- определение степени поражения растений вирусными и грибными заболеваниями;
- оптимизация минерального питания;
- минимизация норм применения пестицидов.

Для аппаратурной реализации описанных методов диагностики растений создано семейство лазерных приборов (рис.7), позволяющих работать как в лабораторных, так и полевых условиях. Они имеют общий принцип действия, но различаются по техническим характеристикам (см. табл.), функциональным возможностям и цене (от 200 до 2000 евро). Процесс измерения и регистрации данных полно-

стью автоматизирован и управляется специально разработанной компьютерной программой. Питание устройств и передача информации происходит по USB-порту персонального компьютера.

Наиболее компактная и простая в эксплуатации модель – ЛАТ-2К (рис.8) предназначена для массовых измерений. Ее возможности несколько ограничены: работает только в режиме пропускания зондирующего пучка. Однако малые габариты и масса (180 г) позволяют использовать это устройство в полевых условиях и проводить оперативные измерения *in situ*, т.е. на месте расположения объекта. Особенно удобен ЛАТ-2К для листовой диагностики.

Более универсальной является модель ЛАТ-3К (рис.9). Ее оптическая схема рассчитана на измерения как в режиме пропускания, так и отражения зондирующего лазерного пучка. В последнем случае размеры измеряемого



**Рис.10.** Измерение микроструктурной организации и динамики хлорофиллфлуоресценции группы растительных клеток на исследовательском приборе ЛАТ-4КМ-Ст

объекта неограниченны. Это обеспечивает возможность тестирования качества плодов и овощей в процессе хранения и в предреализационный период. Сменные оптические модули позволяют работать с разными длинами волн зондирующего излучения.

ЛАТ-4КМ-Ст (рис.10) предназначен для научных исследований и может измерять как крупные, так и микроскопические биообъекты. Обладает высокой информационной емкостью (восемь диагностических показателей). Позволяет количественно оценивать микроструктурную организацию тканей и ее динамические перестройки, пригоден для тестирования биотехнологических объектов. Преимуществом прибора является возможность наблюдения измеряемой группы клеток на экране монитора ПК в течение измерений. Сменные модули дают возможность работать с различными длинами волн зондирующего излучения. Наличие подвижного стохастического экрана позволяет использовать ЛАТ 4КМ-Ст в качестве лазерного микроскопа высокого разрешения для наблюдения и компьютерной регистрации таких малых цитологических объектов, как хлоропласты и хромосомы.

**И** В соответствии с соглашением РОСНАНО приобретает у компании IPG Photonics до 25,01% долей НТО «ИРЭ-Полюс» стоимостью до 50 млн. долл. Компания известна своими передовыми разработками волоконных лазеров, применяе-

Удивительно, что такое яркое в прямом и переносном смысле явление, как хлорофиллфлуоресценция, не обратило на себя внимание в исследованиях оптических свойств фотосинтезирующих тканей. Нам не известна ни одна работа и ни один прибор, в которых при измерении коэффициентов отражения или пропускания листьев учитывали двухкомпонентную природу регистрируемого сигнала. Возбуждение ХФ происходит практически во всем видимом диапазоне, а спектр ее излучения соответствует области чувствительности большинства применяемых фотоприемников. При этом, как было показано выше, интенсивность ХФ может весьма быстро изменяться во времени и значительно превосходить рассеянный зондирующий поток. Естественно, это приводит к значительной погрешности измерений.

В то же время парадоксальное на первый взгляд поведение регистрируемого сигнала, нестабильность его амплитудно-фазовых характеристик несут важную информацию о состоянии и функционировании живого организма. С одной стороны, это заставляет пересмотреть сложившиеся методические подходы к измерению оптических параметров фотосинтезирующих тканей. С другой, предоставляется возможность для разработки новых, более эффективных методов неразрушающей экспресс-диагностики растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мерзляк М.Н., Погосян С.И. и др. Использование спектроскопии отражения в анализе пигментов высших растений. – Физиология растений. 2003, т. 50, № 5.
2. Будаговская О.Н. Оптическая дефектоскопия плодов. – Тамбов: Пролетарский Светоч, 2009.

мых для резки, сварки, наплавки, микрообработки и гравировки металлических деталей, а также в высокотехнологичном телекоммуникационном оборудовании для дальнемагистральной связи. Первоначально РОСНАО приобретает 12,5% долей

3. Лазерное дистанционное зондирование растительности./Под ред. А. Румянцева. – Л., 1987
4. **Беляев Б.И., Катковский Л.В.** Оптическое дистанционное зондирование. – Минск: БГУ, 2006.
5. **Бородин И.Ф., Будаговский А.В., Будаговская О.Н.** и др. Применение эффекта фотоиндуцированной изменчивости оптических свойств хлорофиллсодержащих тканей для диагностики функционального состояния растений. – Доклады РАСХН, 2008, № 5.
6. **Борен К., Хафмен К.** Поглощение и рассеяние света малыми частицами. – М.: Мир, 1986.
7. **Будаговская О.Н., Будаговский А.В., Будаговский И.А.** Лазерная диагностика растений. – Мичуринск-наукоград РФ, 2010.
8. **Budagovsky A., Budagovskaya O., Lenz.F.** et al. Analysis of functional state of cultivated plants by means of interference of scattered light and chlorophyll fluorescence. – J. Applied Botany, 2002, v.76.
9. **Албертс Б.** и др. Молекулярная биология клетки. В 3-х томах. – М.: Мир, 1994.
10. **Hart J.** Light and plant growth. – London: Unwin Hyman Ltd, 1988.
11. **Брандт А.Б., Тагеева С.В.** Оптические параметры растительных организмов. – М.: Наука, 1967.
12. **Корнеев Д.Ю.** Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. – К.: Альтерпрес, 2002.
13. **Maxwell K., Johnson G.N.** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. – J. Exp. Bot., 2000, v.51, №345.
14. **Веселовский В.А., Веселова Т.В.** Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. – М.: Наука, 1990.
15. **Kautsky H., Franck U.** Chlorophyllfluoreszenz und Kohlenstoffassimilation. – Biochemische Zeitschrift., 1943, z. 315.
16. Portable fluorometer PAM-2000. Handbook of operation with examples of practical application. – Heinz Walz GmbH, 1993.

за 25 млн. долл. Инвестиции РОСНАНО будут направлены на расширение производственных мощностей компании в г. Фрязино Московской области, развитие продаж и новых технологий.

[www.rosnano.com](http://www.rosnano.com)