

Передумови створення винаходу

Даний винахід стосується системи детектування флуоресценції для визначення значущих параметрів рослини, яка має джерело збудження, що являє собою малопотужний лазер, призначений для генерування збуджувального випромінювання в червоній ділянці спектра, променетвірний оптичний пристрій, дихроїчний подільник променя, базовий детектор флуоресценції, що містить вхідний оптичний пристрій, призначений приймати випромінювання флуоресценції, яке пройшло через дихроїчний подільник променя, та інтерференційний світлофільтр, що затримує сигнал пружно розсіяного в зворотному напрямку світла, а також має електронний вимірювальний блок, призначений для детектування сигналу флуоресценції, і електронний блок запуску і синхронізації.

Спочатку розглянуто явище флуоресценції молекул хлорофілу.

Поглинене рослинами зі спектра сонячного випромінювання ($380 < \lambda < 750 \text{ нм}$) фотосинтетично активне випромінювання (ФАВ) використовується ними головним чином для перетворення поглиненої енергії світла на енергію хімічних зв'язків (фотосинтез) і нагромадження у вигляді хімічної енергії. Цей процес прямо пов'язаний з поглинанням (асиміляцією) діоксиду вуглецю і вивільненням кисню (що звичайно називають продуктивністю). Існують два інших можливих шляхи, що забезпечують підтримку енергетичної рівноваги в рослин у результаті поглинання енергії. Так, зокрема, для такого регулювання можуть використовуватися, по-перше, випускання теплової енергії, а по-друге, випромінювання флуоресценції.

Теплова енергія складається із сонячної енергії видимої ділянки (ВД) і короткохвильової інфрачервоної (КХІЧ) ділянки спектра сонячного випромінювання. КХІЧ-випромінювання прямо поглинається водою, яка міститься в листі. На відміну від цього при поглинанні ВД-випромінювання відбувається екситонний перенос енергії всередині використовуюваного як світлозбиральна антена пігменту реакційних центрів (фотосистема (ФС) I; фотосистема (ФС) II) і світлозбирального комплексу (СЗК). У цьому процесі енергія поглиненого фотона перетворюється на енергію, потрібну фотосистемам ФС I і ФС II. Надлишок енергії запасується на колиальному й обертальному енергетичному рівнях і таким шляхом у підсумку перетворюється на тепло.

У ФС I і ФС II поглинена енергія може використовуватися в так званих фотореакціях, перетворюватися на тепло або в підсумку випускатися у вигляді випромінювання флуоресценції. Флуоресценцію в червоній ділянці спектра випускають молекули хлорофілу, наявні у ФС I, ФС II і в СЗК. Імовірність перетворення енергії на тепло і флуоресценцію вважаються постійними в часі, тоді як швидкість перетворення енергії у фотореакції розглядається як функція стану реакційного центра (ланцюг переносу електронів) і ступеня фосфорилування фотосинтетично активних клітинних мембран. Частку збудженої сонячним світлом флуоресценції $F_{\text{сонц.}}(t)$, що випускається реакційними центрами, можна описати таким рівнянням (1):

$$F_{\text{сонц.}}(t) = \frac{k_{\text{флуоресц.}}}{k_{\text{флуоресценц.}} + k_{\text{тепло}} + k_{\text{фотосинтез}}(\Phi, M)} \cdot \int_{\text{ФАВ}} I_{\text{погл.сонц.}} d\lambda. \quad (1)$$

де

k_1 означають імовірність перетворення енергії на флуоресценцію, тепло і продукти фотосинтезу відповідно,

$\Phi(t)$ означає стан реакційного центра,

$M(t)$ означає фосфорилування мембрани,

$I_{\text{погл.сонц.}}$ означає спектральну густину потоку поглиненого сонячного випромінювання.

Як впливає з наведеного вище рівняння, характеристика залежної від часу флуоресценції молекул хлорофілу дозволяє судити про відносну зміну фотосинтетичної активності, якщо припустити, що "Ф" і "М" є функціями часу.

Нижче розглянуто основні принципи детектування й аналізу інтенсивності флуоресценції молекул хлорофілу.

Складність детектування збудженої сонячним світлом флуоресценції молекул хлорофілу зумовлена тим, що на сигнал флуоресценції накладається відбите світло (пасивний спектр). На частку сигналу флуоресценції, що випускається листям або рослинним покривом, припадає лише близько декількох відсотків від рівня повного сигналу. Тому для вимірювання флуоресценції молекул хлорофілу в найрізноманітніших цілях були розроблені різні методи вимірювань, у яких використовувалися додаткові джерела світла.

Звичайно до енергетичної експозиції сонячного випромінювання (інсоляції) " $I_{\text{погл.сонц.}}$ " додається модульоване або імпульсне джерело світла, який індукує появу модульованого чи імпульсного сигналу флуоресценції $F_{\text{дод.}}(t)$, який накладається на сигнал $F_{\text{сонц.}}(t)$ флуоресценції, збудженої сонячним світлом, і сигнал ОС (λ) відбитого світла. При використанні для збудження лазерного джерела виникає так звана люмінесценція з лазерним збудженням (ЛЛЗ). При цьому рівняння (1) набуває такого вигляду:

$$F_{\text{сонц.}}(t) + F_{\text{дод.}}(t) = \frac{k_{\text{флуоресц.}}}{k_{\text{флуоресценц.}} + k_{\text{фотосинтез}}(\Phi, M)} \cdot \int_{\text{ФАВ}} (I_{\text{погл.сонц.}} + I_{\text{дод.}}) d\lambda.$$

Повний сигнал, який зазвичай детектується, складається із суми всіх сигналів флуоресценції і сигналу ОС (λ) відбитого світла. Відповідна техніка дає змогу відокремити сигнал флуоресценції, збудженої додатковим джерелом світла, від пасивного спектра і від флуоресценції, збудженої сонячним світлом, навіть в умовах денної освітленості на відстані в межах від нульового при прямому контакті з джерелом флуоресценції (патент DE 3518527 на ім'я Schreiber, 1986, заявка EP 0434644 B1 на ім'я Mazinghi, 1991) до одного метра (патент US 5412219 на ім'я Chappelle, 1995) і навіть декількох сотень метрів (заявка EP 0419425 B1 на ім'я Cecchi Pantani, 1995).

Важливою технічною вимогою, ставленою до всіх систем як для контактних, так і дистанційних вимірювань, є використання такого додаткового джерела світла, яке, з одного боку, має бути досить сильним для того, щоб інтенсивність сигналу збудженої флуоресценції перевищувала інтенсивність випромінювання пасивного спектра, але яке, з другого боку, має бути досить слабким, щоб не порушувався фізіологічний стан фотосинтетичної системи.

Рівень техніки

У добре відомому флуориметрі з амплітудно-імпульсною модуляцією (AIM) (патент DE 3518527 на ім'я Schreiber та ін., 1986) флуоресценція молекул хлорофілу збуджується слабким вимірювальним світловим випромінюванням (червоний світловипромінювальний діод (СВД)) через оптичне волокно без зміни фотосинтетичного стану рослини. Флуоресценція передається по оптичному волокну до фотодіода, що детектує все випромінювання флуоресценції з довжиною хвилі понад 700нм. Включене вимірювальне світлове випромінювання не стимулює ніякої фотосинтетичної активності в рослинах, адаптованих до темноти.

Опромінення листя, адаптованого до темноти, інтенсивним світловим спалахом тривалістю від декількох мілісекунд до декількох секунд (іменованим насичувальним світловим імпульсом) викликає максимально можливу флуоресценцію (позначувану F_m), але не індукує фотосинтезу. Безперервне опромінення ненасичувальним світлом (іменованим актинійним світлом) індукує фотосинтетичну активність. Після опромінення протягом певного періоду часу, від декількох секунд до декількох хвилин, усі сприятливі для фотосинтезу реакції зрівноважуються з випромінюваним джерелом світла світловим випромінюванням, і інтенсивність флуоресценції тим самим досягає сталого значення F_s . Перехідний процес при флуоресценції, пов'язаний зі зміною її інтенсивності під час опромінення адаптованого до темноти листя, має назву ефект Кауцького (Kautzky). На фіг.1 як приклад наведено отриману в результаті вимірювань діаграму кінетики Кауцького для огірка. Флуоресценція, виявлена на довжині хвилі 685нм, збуджувалася виключно лазерними імпульсами. Опромінення світлом від точкової галогенної лампи потужністю 500Вт впливало тільки на фотосинтетичний стан, а тим самим і на $K_{\text{фото}}$. На частку такого світла в сигналі флуоресценції, насамперед як збуджувального джерела, припадає нехтовно мала величина. AIM-флуориметр звичайно працює в прямому контакті з листами, але може використовуватись і для дистанційних вимірювань при видаленні від досліджуваного об'єкта на кілька сантиметрів.

Нижче розглянуто основні принципи детектування й аналізу співвідношення інтенсивностей червоної флуоресценції.

При збудженні УФ-випромінюванням у типовому спектрі флуоресценції рослини присутні дві домінуючі смуги (фіг.2): одна в діапазоні від 400 до 600нм (іменована синьо-зеленою (СЗ) флуоресценцією), а друга в діапазоні від 650 до 800нм (іменована червоною флуоресценцією; F685, F730). На фіг.2 як приклад наведено діаграму, на якій показано спектр флуоресценції кукурудзи, вирощеної в теплиці. Джерелом флуоресценції на довжинах хвиль 685нм і 730нм (позначається як F685 і F730) є тільки хлорофіл, наявний у листі. Джерелом синьо-зеленої (СЗ) флуоресценції є головним чином фенольні компоненти клітинних стінок.

Характеристики емісії здорових рослин тісно пов'язані з морфологією рослини, наприклад з такими параметрами, як склад і концентрація пігментів. Якщо рослини заражені грибами, то в спектрі випромінювання можлива поява додаткових ознак, що вказують на це.

З експериментальних даних відомо, що випромінювання на довжинах хвиль 685 і 730нм пов'язане, як описане вище, з фотосинтезувальною системою, і тому його зміни в часі на обох довжинах хвиль практично однакові. І навпаки, відношення інтенсивностей флуоресценції F685/F730 для окремої рослини або листа стає в часі і залежить тільки від оптичних властивостей листа (рівняння (2)):

$$\frac{F_{685}}{F_{730}} = \Psi_{730}^{685} A \frac{e^{-(\beta_1 + c \cdot \alpha_1)d} - 1}{e^{-(\beta_2 + c \cdot \alpha_2)d} - 1} \quad (2)$$

де

Ψ означає спектральну характеристику флуоресценції на довжинах хвиль λ 685 і 730нм,

β означає коефіцієнт розсіювання на довжинах хвиль λ 685 і 730нм,

c означає концентрацію хлорофілу,

α означає коефіцієнт питомого поглинання на довжинах хвиль λ 685 і 730 нм,

d означає товщину листа,

A являє собою константу, яка також містить коефіцієнти α , β , c , d .

Спектр випромінювання флуоресценції перекривається зі смугами поглинання пігменту при довжині хвилі близько 685нм (фіг.3), і тому фотони (флуоресценції), що випускаються, селективно повторно поглинаються при їхньому проходженні через тканини листа, у результаті чого відношення F685/F730 набуває вигляду експонентної залежності від таких параметрів, як середня довжина вільного пробігу світла в листі, коефіцієнт розсіювання і концентрація хлорофілу. На фіг.3 показана діаграма, що відображає форму кривої питомого поглинання (a) випромінювання молекулами хлорофілу a і форму кривої відповідного спектра флуоресценції (Ψ).

При переході рослин від повністю адаптованого до темноти стану до адаптованого до світла стану проявляється єдина зміна описаної вище тимчасової залежності відношення інтенсивностей флуоресценції. Було встановлено, що така невелика зміна відбувається при переході від темноти до освітленості, що відповідає ранньому ранку, від післяполуденної освітленості до вечірньої освітленості й у кінетиці Кауцького. Ніякої істотної залежності або кореляції між співвідношенням інтенсивностей червоної флуоресценції і загальною енергетичною експозицією при денному освітленні не було виявлено. Тому передбачається, що ці зміни пов'язані зі змінами оптичних властивостей листових тканин. Це явище можна було б пояснити зміною орієнтації органел рослини (наприклад хлоропластів) у бік джерела освітлення, однак це питання залишається об'єктом подальших досліджень.

Проте це співвідношення дає змогу вимірювати відносні зміни концентрації хлорофілу для даного виду рослин, якщо припустити, що окремі рослини одного виду мають схожу морфологію. Це означає, що коефіцієнт розсіювання всередині листа і геометрія листа є порівнянними показниками.

У Mazzinghi (заявка EP 0434644 B1, 1991, і стаття P. Mazzinghi: "A laser diod fluorimeter for field measurements of the F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio", опублікована в "Review of Scientific Instruments", т.67, №10, жовтень 1996, стор.3737-3744, XP000635835, Нью-Йорк, США) описано "прилад для двоканальних вимірювань флуоресценції молекул хлорофілу". Ця портативна компактна система призначена для прямого контактного вимірювання співвідношення інтенсивностей флуоресценції F690/F730 (відповідно F685/F730), а

також для вимірювання значення Rfd на обох довжинах хвиль з використанням гелій-неонового чи діодного лазера як джерела безперервного збудження. При роботі в умовах повної освітленості сонячним світлом в отриманих при кожному вимірюванні результатах потрібно окремо враховувати (і потім віднімати) залишкове фонове світло (пасивний спектр) з огляду на пряме відбиття світла від листа, оскільки таке фонове світлове випромінювання неможливо повністю придушити за допомогою фільтра, встановленого на зразку.

Нижче розглянута синьо-зелена (C3-) флуоресценція.

Виявити походження та ідентифікувати джерело C3-флуоресценції значно складніше, і вона усе ще є предметом наукових дискусій. Джерелом синьо-зеленої флуоресценції є в основному стінки клітин у верхньому шарі листа, і лише невелика її частина випускається клітинами, розташованими на глибших шарах.

У хлоропластів синьої флуоресценції не спостерігається, оскільки домінантною є червона флуоресценція молекул хлорофілу. Однак відомо, що НАДФ-Н в хлоропластах випускає синю флуоресценцію. Було встановлено також, що на клітинному рівні флуоресціювальні коферменти, такі як НАД-Н чи НАД(Ф)-Н, є винятково чутливими біоіндикаторами метаболічних процесів, таких як розщеплення глюкози або дихання. Таким чином, синє випромінювання НАДФ-Н залежить від фізіологічного стану рослини.

У листі випромінювання, яке йде з ферментів і коферментів повністю маскується випромінюванням, яке йде з клітинної стінки, де є кілька компонентів рослин. Добре відомо, що рослинні фенольні сполуки, ферулова, хлорогенова і кофеїнова кислоти, а також кумарини є джерелами синьої флуоресценції, а алкалоїди і флавоноли є джерелами зеленої флуоресценції.

Далі розглянуто основні принципи детектування й аналізу інтенсивності C3-флуоресценції.

У даний час на основі існуючих знань про C3-флуоресценцію не існує загальноприйнятої методики аналізу повної інтенсивності C3-флуоресценції. При цьому з високим ступенем надійності ідентифіковано багато її джерел, однак їхній вплив на інтенсивність повного сигналу досі не відомий.

Зв'язок з механізмом фотосинтезу, порівнянний з описуванням рівнянням (1), було виявлено тільки для флуоресценції НАДФ-Н. Якщо припустити, що C3-флуоресценція від всіх інших її джерел не залежить від часу, то можна контролювати і такі перехідні або нестійкі процеси C3-флуоресценції.

У цілому джерелом випромінювання є інші компоненти рослини, наприклад епідермальний шар клітин, насамперед клітинні стінки, або ж вакуолі, а також клітини мезофілу. Усі ці компоненти не містять хлорофілу, а отже, не впливають на фотосинтез. Однак основною інформацією, яку можна одержати на основі аналізу інтенсивності C3-флуоресценції, є оцінка кількості пігментів рослини (тканини), які випромінюють у цій спектральній ділянці.

Далі розглянуто основні принципи детектування й аналізу параметрів співвідношення інтенсивностей C3-флуоресценції.

Визначення спектральних характеристик C3-флуоресценції при особливому обліку одночасно вимірюваної червоної флуоресценції дає змогу нормувати інтенсивність флуоресценції (на інтенсивність флуоресценції молекул хлорофілу) і дає змогу тим самим зробити процес вимірювання менш чутливим до калібрування і флуктуацій сигналу при послідовно проведених вимірюваннях.

У цьому плані було досліджено принаймні чотири різних аспекти, які були підтверджені в порівняльних лабораторних чи польових експериментах і які можна диференціювати за спектральними характеристиками у синій, зеленій і червоній ділянках спектра:

ідентифікація одно- і двочасткових рослин (синя-зелена-червона),

синтез захисних проти УФ-випромінювання пігментів (УФ стрес) (синя-червона),

зараження несправжньою борошнистою россою, іржею та іншими хворобами (грибами) (синя-зелена-червона),

виявлення некрозу листа в голках сосни (синя-зелена).

Коли поверхня листа покрита іншим органічним матеріалом, наприклад у випадку зараження грибами, спектр флуоресценції інфікованого листа змінюється двома різними шляхами:

власна флуоресценція грибів селективно підсилює (чи змінює) C3-флуоресценцію,

гриби на поверхні знижують інтенсивність червоної флуоресценції, поглинаючи збуджувальне світло і тим самим зменшуючи глибину його проникнення. Аналогічний ефект спостерігається в тому випадку, коли збуджувальне світло дифузно відбивається додатковим шаром тканини на поверхні рослини.

Останній ефект відомий також у випадку утворення усередині вакуолю епідермальних клітин захисних проти УФ-випромінювання пігментів, що перешкоджають проникненню збуджувального УФ-випромінювання в більш глибокі клітинні шари й у результаті селективно придушують флуоресценцію молекул хлорофілу. Звичайно ці пігменти (наприклад антоціанін) є речовинами, що тільки поглинають випромінювання, і не впливають тому на повний сигнал флуоресценції.

Для успішного збору даних потрібне виконання таких попередніх умов.

Насамперед слід враховувати, вимірюється активне чи неактивне світло. Залежно від цілей дослідження може виникнути потреба виключити вплив джерела збуджувального світла на фотосистему. В усіх випадках, коли інтенсивність флуоресценції має істотне значення при вимірюваннях, збудження не повинне впливати на стан рослини. Цей стан повинен залежати тільки від навколишніх параметрів, таких як інсоляція, життєздатність або стан здоров'я рослини.

Можливість заздалегідь виключити вплив збудження дає змогу вимірювати освітленість і в результаті оцінювати відповідно життєздатність або стан здоров'я рослини.

Сказане практично не стосується вимірювання відносної концентрації хлорофілу, оскільки обидві смуги випромінювання флуоресценції однаково залежать від цієї концентрації, однак уже при порівнянні червоної флуоресценції із синьою флуоресценцією розбіжність у походженні смуг випромінювання вказує на потребу контролювати інтенсивність випромінювання в максимально можливому ступені.

З іншого боку, незбурена (збуджувальним світлом) фотосистема дає змогу одержати інформацію, що характеризує рослини, за рахунок контролю параметрів навколишнього середовища. Зміна, наприклад, прихідної світлової енергії або стану здоров'я рослини дають змогу встановити правила проведення

вимірювань, щоб інтерпретація флуктуації інтенсивності флуоресценції стала можливою. Такий підхід широко використовується в уже згадуваній вище АІМ-флуориметрії або при щоденних вимірюваннях за допомогою лідарних систем для проведення вимірювань у полі в дальній зоні (у зоні Фраунгофера).

Крім цього, потрібно враховувати відношення сигнал-фон. Відношення сигнал-фон для активно збудженої флуоресценції визначається як сума кількості фотонів, пасивно відбитих листовими тканинами (ОС), фотонів збудженої сонячним світлом флуоресценції ($F_{\text{сонц.}}$) і фотонів випроміненої флуоресценції (стимульованої збуджувальним вимірювальним світлом ($F_{\text{дод.}}$)), ділена на суму кількості фотонів, пасивно відбитих тканинами листа (ОС), і фотонів збудженої сонячним світлом флуоресценції ($F_{\text{сонц.}}$).

Щоб визначити внесок кожного з цих сигналів, тобто корисного сигналу і фонового випромінювання, у повний детектований сигнал потрібно визначати кожний з них. У техніку лідарних систем для проведення вимірювань у полі в дальній зоні інтенсивність збуджувального імпульсу настільки висока, що інтенсивність пасивного фону нехтовно мала в порівнянні зі збудженою флуоресценцією. Однак основна вада цього методу полягає у високій вартості відповідної системи збудження (лазера), у винятково високих витратах на забезпечення роботи лазера (енергоживлення, обмеження з безпеки для зору, використання високоточної оптики) і в невизначеності умов освітленості в місці розташування рослини при проведенні вимірювань.

Крім того, потрібно враховувати також відношення сигнал-шум. У моноімпульсному режимі роботи відношенням сигнал-шум визначається, чи здатна система детектування вимірювати сигнал флуоресценції від кожного збуджувального імпульсу. Основними джерелами шуму, що визначають відношення сигнал-шум, є такі:

- чутливість детектора фотонів,
- потужність фонового сигналу ($S_{\text{т1}}$),
- потужність сигналу активної флуоресценції ($F_{\text{лазер}}$),
- відстань, на якій проводиться вимірювання,
- вхідна апертура системи детектування.

Перше джерело визначається характеристиками детектора, тоді як інші три залежать від так званого "дробового шуму".

Фотоелектронні помножувачі (ФЕП), насамперед при роботі в безперервному режимі, є детекторами з винятково низьким рівнем шумів, який значно нижче від рівня фотонного (дробового) шуму навіть при високому коефіцієнті підсилення. Оптична система порівняно великих розмірів для того, щоб вона була здатна збирати фотони флуоресценції в кількості, достатній для виключення внесених дробовим шумом викривлень сигналу, дозволяє працювати в моноімпульсному режимі. Сказане є обов'язковою умовою у всіх випадках, коли положення досліджуваного об'єкта (мішені) швидко змінюється.

Якщо мішень нерухома щодо системи детектування, то можна використовувати, наприклад, метод входження в синхронізм, щоб відокремити зашумлений сигнал флуоресценції від шумів, унесених будь-яким іншим джерелом, незалежно від того, є вони дробовими шумами чи шумами детектора. У цьому випадку можна знизити вимоги до оптичної системи (зменшення апертури) чи замінити фотоелектронний помножувач на дешевший лавинний або звичайний фотодіод.

У патенті US 5426306 описаний флуориметр із високою частотою повторення імпульсів, призначений для вимірювань *in vivo* флуоресценції чи фітопланктону вищих рослин з використанням серій повторюваних з високою частотою збуджувальних спалахів. Така система збуджує змінну в часі флуоресценцію, що дає змогу визначати параметри фотосинтезу, такі як сама змінна в часі флуоресценція, ефективний перетин поглинання, швидкість потоку електронів і повторюваність процесів фотосинтезу. Описаний у зазначеному патенті пристрій використовується для вимірювання флуоресценції зразків як функції від серії збуджувальних спалахів.

У WO 91/10352 описано спосіб автоматичного виявлення рослин шляхом вимірювання інтенсивності флуоресценції молекул хлорофілу. Відповідно до цього способу флуоресценція збуджується джерелом світла з довжиною хвилі менш ніж 550нм. Випромінювання флуоресценції детектується камерою, оснащеною широкосмуговим режекторним фільтром (який пропускає випромінювання з довжинами хвиль понад 600нм і затримує випромінювання з довжинами хвиль менш ніж 600нм). При цьому активне придушення фонового випромінювання не використовується. Тому рекомендується застосовувати досить сильне джерело світла для одержання інформативного зображення, при цьому випромінювання від джерела світла, безпосередньо відбите від рослини або субстрату, не попадає в камеру.

Стислий виклад суті винаходу

В основу даного винаходу було покладено задачу розробити дешевшу високоефективну систему детектування флуоресценції, що давала б змогу знизити потрібну потужність збудження за рахунок використання лазера малої потужності, якої, однак, досить для стимулювання емісії у вимірюваних кількостях, і яка дозволяла б знизити вплив фонового сигналу на результати вимірювань.

Ще однією задачею даного винаходу було розробити новий технічний підхід до вимірювання добре відомих фізіологічних параметрів рослин за деяких умов з найбільш високою точністю визначення відповідних умов вимірювання і навколишніх умов.

Згідно із цим винаходом пропонується в ньому система детектування флуоресценції для визначення значущих параметрів рослинності відрізняється тим, що малопотужний лазер, використовуваний як джерело збудження, являє собою імпульсний лазер з високою частотою повторення імпульсів тривалістю в декілька наносекунд, що генерує збуджувальне випромінювання оптимально в червоній ділянці спектра з довжиною хвилі оптимально 670нм, дихроїчний подільник променя служить для спрямовування сформованого збуджувального променя коаксіально до оптичної осі приймальної оптики без використання світловодів на рослинну мішень, яка є досліджуваним об'єктом, базовий детектор флуоресценції служить для формування зображення плями збуджувального випромінювання на чутливій поверхні детектора, електронний вимірювальний блок виконаний з можливістю роботи на частоті, яка дорівнює подвоєній частоті повторення імпульсів лазерного джерела збудження, і дискретизації активного сигналу флуоресценції синхронно з

лазерним випромінюванням, з одного боку, і пасивного фоновому сигналу з фіксованою затримкою в мікросекундному інтервалі перед чи після активного сигналу, з другого боку, шляхом реєстрації цих сигналів за допомогою швидко дійної схеми з дискретизацією і збереженням відліків, пов'язаної з аналого-цифровим перетворювачем, що забезпечує цифрове оброблення сигналів, при цьому зазначений електронний вимірювальний блок має також засоби для виділення чистого сигналу флуоресценції відніманням фоновому сигналу від активного сигналу флуоресценції електронним шляхом або при наступному обробленні, і електронний блок запуску і синхронізації служить для синхронізації лазерних імпульсів з інтервалами дискретизації електронного вимірювального блоку.

Таким чином, ця система дає змогу точно вимірювати фоновий сигнал. Сигнал флуоресценції $F_{\text{лазер}}$, який становить інтерес, розраховується шляхом віднімання пасивного сигналу від повного сигналу:

$$F_{\text{лазер}} = S_{t2} - S_{t1},$$

де "S" означає величину сигналу в моменти часу "t1" і "t2" (нижні індекси):

$$S_{t1} = I_R + F_{\text{солнц.}}$$

$$S_{t2} = I_R + F_{\text{солнц.}} + F_{\text{лазер.}}$$

У момент "t1" активне збудження дорівнює нулю, а в момент "t2" активний сигнал флуоресценції додається до пасивного сигналу.

Щоб знизити потрібну потужність збуджувального випромінювання розміри вимірювальної плями, а тим самим і плями збуджувального випромінювання можна зменшувати доти, доки частка фоновому сигналу в повному сигналі не знизиться до рівня активного сигналу флуоресценції.

Ці та інші вирізняльні особливості і переваги винаходу докладніше розглянуто нижче на прикладі деяких варіантів його виконання з посиланням на додані креслення.

Стислий опис креслень

На доданих до опису кресленнях показано:

на фіг.1 - розглянута вище діаграма кінетики Кауцького,

на фіг.2 - розглянутий вище типовий спектр флуоресценції,

на фіг.3 - розглянута вище діаграма, що відображає форму кривої питомого поглинання (α) випромінювання молекулами хлорофілу а і форму кривої відповідного спектра флуоресценції (ψ),

на фіг.4 - схематичне зображення базової конфігурації одноканальної системи за винаходом для визначення інтенсивностей флуоресценції,

на фіг.5 - тимчасова діаграма, що ілюструє роботу пропонованої системи при оперативній корекції на фоновий сигнал (із зображенням запускового сигналу діодного лазера і запускового сигналу електронного вимірювального блоку при вимірюванні активних і пасивних сигналів) і

на фіг.6а і 6б - зображення, на яких відповідно у виді збоку і спереду показане розташування елементів оптичної частини детекторного модуля, призначеної для реєстрації додаткових спектральних характеристик флуоресценції і сигналів пружно розсіяного в зворотному напрямку світла.

Оптимальні варіанти виконання винаходу

На фіг.4 показана система в базовій конфігурації, призначена для детектування інтенсивності флуоресценції молекул хлорофілу і складена з п'яти апаратних компонентів, якими є лазерне джерело 1 збудження, у функції якого використовується діодний лазер, що генерує випромінювання з довжиною хвилі 670нм і оснащений променетвірною оптикою 2, детектор 3 флуоресценції з приймальною оптикою 4, яка формує зображення, і з оптичним пристроєм 5 поділу каналів, електронний блок 6 запуску і формування затримки для синхронізації лазера і детектора, електронний вимірювальний блок 7, що являє собою модуль реєстрації й оброблення сигналу, і блок 8 електроживлення.

Джерелом 1 збудження служить малопотужний лазер (максимальна потужність $>0,5\text{Вт}$) з високою частотою повторення (1-50кГц) імпульсів тривалістю кілька десятків наносекунд (10-50нс). Для ефективної стимуляції флуоресценції молекул хлорофілу оптимально використовувати збуджувальне випромінювання з довжиною хвилі 670нм. З випромінюванням цієї довжини хвилі в 670нм збігається смуга сильного поглинання молекулами хлорофілу випромінювання в червоній ділянці спектра, завдяки чому і забезпечує високоефективне збудження. Лазерний промінь формується за допомогою променетвірної оптики 2, яка складається з лінзи з корекцією астигматизму (циліндричної лінзи) і блоку розширення/стиску пучка в точкову пляму. Після випромінювання промінь надходить коаксіально до оптичної осі 9 у приймальну оптику 4 детектора, проходячи через дихроїчний подільник променя (дихроїчне дзеркало), що утворює оптичний пристрій 5 поділу каналів.

Як детектор 3 можна використовувати фотоелектронний помножувач (ФЕП), що працює в безперервному режимі, коли за допомогою описаної системи вимірювання проводяться в моноімпульсному режимі на досліджуваних об'єктах (мішенях), які швидко змінюють своє положення. Як детектор можна використовувати і лавинний або звичайний фотодіод, якщо мішень нерухома, при цьому для реєстрації сигналу допустиме використання методу входження в синхронізм. Вхідну апертуру утворює сферична лінза, що формує зображення точкового збуджувального джерела світла (плями збуджувального випромінювання) на екранованій (зокрема польовою діафрагмою) чутливий поверхні детектора. Сигнал пружно розсіяного у зворотному напрямку світла затримується інтерференційним (ІФ-) світлофільтром 10. Центральна довжина хвилі пропущення ІФ-світлофільтра 10 вибирається відповідно до довжин хвиль випромінювання, яке становить інтерес, у діапазоні 680-740нм. Ширина смуги пропущення не має істотного значення, при цьому рекомендована ширина смуги пропущення становить 10 або 15нм. Якість затримування випромінювання поза смугою пропущення повинна бути дуже висока ($>10^3$), оскільки довжини хвилі збуджувального і детектованого випромінювань розташовуються дуже близько одна від одної. Імовірність перекручування сигналу не повністю затриманими фільтром збуджувальними фотонами висока, оскільки інтенсивність сигналу розсіяного в зворотному напрямку світла на кілька порядків перевищує інтенсивність сигналу флуоресценції.

Електронний блок 6 запуску і синхронізації має керувати ввімкненням лазера і синхронізувати лазерний імпульс з інтервалом дискретизації в електронному вимірювальному блоці 7. Для застосування в сільському

господарстві, садівництві і тепличному господарстві затримку на проходження імпульсу можна відрегулювати на постійне значення завдяки незмінній геометрії розташування всіх елементів вимірювальної системи. Змінами в часі поширення сигналу з огляду на відмінності у відстанях між детектором 3 і мішенню можна знехтувати, оскільки очікувана зміна відстані в межах порядку ± 10 см (а тим самим і зміна затримки поширення променя) мала в порівнянні з тривалістю збуджувального імпульсу (наприклад, якщо $\tau_{\text{лазер}} = 20$ нс, то допустима зміна відстані може становити кілька метрів, не приводячи до помилкового спрацювання системи).

Щоб забезпечити в режимі реального часу корекцію сигналу з обліком відбитого сонячного світла і флуоресценції, збудженої сонячним світлом, електронна система детектування працює на частоті, яка дорівнює подвоєній частоті повторення імпульсів збуджувального лазера. На фіг.5 подана тимчасова діаграма, що ілюструє роботу системи в базовій конфігурації за фіг.4 при оперативному усуненні фонових випромінювань, при цьому на діаграмі показано запускарський сигнал діодного лазера і запускарський сигнал електронного вимірювального блоку при вимірюванні активних і пасивних сигналів. Синхронно з початком випромінювання лазером імпульсу починається інтервал дискретизації для проміжку детектування активного сигналу (лазер включається в момент S_{t1}). Після закінчення фіксованого часу затримки тривалістю в декілька мікросекунд реєструється сигнал пасивного фону (лазер виключається в момент S_{t2}). В електронному вимірювальному блоці 7, показаному на фіг.4, до реєстратора сигналів, виконаному у вигляді швидкодійної схеми дискретизації зі збереженням відліків (СДЗВ), що має аналогову смугу пропускання 40-200 МГц, підключено аналого-цифровий перетворювач (АЦП), що дозволяє обробляти сигнал відповідно до конкретного застосування системи. Якщо потреби в роботі в моноімпульсному режимі немає, то електронний вимірювальний блок 7 виконують у вигляді синхронного підсилювача. І, нарешті, призначення блоку 8 електроживлення полягає в забезпеченні електроенергією всіх апаратних компонентів системи.

В одному з конкретних варіантів виконання запропонованої системи її робоча відстань, тобто відстань до досліджуваного об'єкта, є більшою чи меншою мірою стала. Однак залежно від конкретної сфери застосування системи ця відстань при різних апаратній конфігурації може змінюватися від нульового при прямому контакті з досліджуваним об'єктом до 1,0 м. Діапазон зміни робочої відстані визначається в процесі калібрування при комплектації і складанні системи.

Тип вихідного сигналу електронного вимірювального блоку 7 залежить від режиму роботи системи. Для подальшого оброблення зареєстрованого сигналу флуоресценції генерується пропорційний йому цифровий сигнал ЦС у вигляді дискретного числа, тоді як для керування підключеними до системи апаратними засобами генерується аналоговий сигнал.

Нижче розглянуто процес визначення співвідношення інтенсивностей флуоресценції молекул хлорофілу.

Описану вище "базову конфігурацію" системи можна модифікувати таким чином, щоб контролювати спектральні характеристики випромінювання флуоресценції. У цьому випадку до базової конфігурації додаються додаткові чутливі елементи, у тому числі фотодетектори й електронні схеми дискретизації (дискретизатори). Як показано на фіг.6а (вид збоку) і 6б (вид спереду), оптична схема модифікована за рахунок додавання дихроїчного(-их) дзеркала (дзеркал) 11, встановленого (-их) на оптичній осі 12 на приймальному боці. Дихроїчне(-ні) дзеркало (-а) розділяє (-ють) світло, яке падає на них, на спектральні компоненти. Крім того, при такій конфігурації забезпечується робота всіх дискретизаторів з однаковими тимчасовими характеристиками. Крім цього, пропонується у винаході система може працювати в оперативному режимі на відміну від описаних у патенті US 5412219 способу і пристрою, коли для одержання повної інформації про спектральний склад потрібно послідовно встановлювати в пристрій цілий ряд фільтрів.

Фоточутливі поверхні додаткового (-их) детектора (-ів) 13 обладнані ІФ-світлофільтрами 14 і додатковими режекторними фільтрами відповідно до потрібного режиму роботи.

Число вимірювальних каналів залежить від цілей дослідження. Для вимірювання концентрації хлорофілу при збудженні діодним лазером 15, що працює на довжині хвилі 670 нм, досить двох каналів (оптимально на довжинах хвиль 685 нм і 730 нм із шириною смуги пропускання ± 5 нм).

Для контролю синьої і/або зеленої флуоресценції потрібно додатково встановити другий лазер. Довжина хвилі збуджувального випромінювання в цьому випадку може лежати в діапазоні від 355 до 400 нм при приблизно тій же потужності і тимчасових характеристиках, що і для червоного діодного лазера, використовуваного для збудження хлорофілу. Збуджувальним випромінюванням обох довжин хвиль повинна опромінюватися та сама ділянка досліджуваного об'єкта. Використання двох різних лазерів дає змогу поліпшити технологію вимірювань, застосовувану згідно з US 5412219 і EP 0419425 B1.

Застосування тільки одного джерела збуджувального випромінювання, що працює тільки в УФ/синій ділянках спектра (355 нм $< \lambda < 400$ нм), не рекомендується. Як зазначено вище, захисні проти УФ-випромінювання пігменти усередині вакуолей епідермальних клітин рослин, що ростуть просто неба, перешкоджають проникненню "УФ/синього" збуджувального випромінювання в глибші клітинні шари і тим самим селективно придушують флуоресценцію молекул хлорофілу. У більшості проведених у польових умовах дослідженнях було встановлено, що сигнал червоної флуоресценції не вдається відокремити від довгохвильового "хвоста" синьо/зеленої флуоресценції.

Для детектування синьої і/або зеленої флуоресценції потрібні три, відповідно чотири детектори.

При ідентифікації рослини потрібний додатковий детектор для реєстрації сигналу пружно розсіяного в зворотному напрямку світла на довжині хвилі червоного діодного лазера (670 нм).

Для виявлення наявності покриттів на поверхні листя або інфекцій (див. нижче) можна додати ще один детектор для реєстрації сигналу пружно розсіяного в зворотному напрямку збуджувального УФ-випромінювання.

Для вимірювання розсіювання світла всередині листа можна додатково передбачити діодний лазер, що генерує випромінювання з довжинами хвиль у ближній інфрачервоній ділянці спектра (800 нм $< \lambda < 1000$ нм), і відповідний детектор для вимірювання сигналу пружно розсіяного в зворотному напрямку світла.

Усі сигнали реєструються схожими електронними схемами детектування. Для застосування в наукових цілях сигнали для їхньої наступного аналізу попередньо обробляються за допомогою аналого-цифрового

перетворення і передаються в комп'ютер. Якщо система використовується для керування (автоматизації) яким-небудь устаткуванням, то набір зареєстрованих і записаних даних буде аналізуватися й інтерпретуватися внутрішнім мікроконтролером, який вироблятиме відповідний керівний сигнал, видаваний на пов'язане із системою вимірювання устаткування.

Нижче розглянуто процес реєстрації допоміжних параметрів.

Залежно від сфери застосування потрібно додатково визначати параметри навколишнього середовища (Е), рослини (Р) і системи (S), такі, наприклад, як:

величина енергії імпульсу діодного лазера (S),
поверхнева густина потоку (сонячного) випромінювання в місці розташування давача (Е),
верхній рівень рослинного покриву (Р),
висота рослинного покриву (Р).

Енергію в лазерному імпульсі потрібно вимірювати в тому випадку, якщо стабільність від імпульсу до імпульсу (СП) або довгострокова стабільність джерела збуджувального випромінювання невисокі. СП в червоного діодного лазера, використовуваного для збудження флуоресценції молекул хлорофілу, становить близько 3%. Отже, такої стабільності повністю досить для одержання достовірних результатів, і тому встановлювати реєстратор енергії не потрібно.

У тих же випадках, коли потрібно контролювати енергію імпульсу, на оптичному шляху з боку джерела збудження встановлюють додатковий фотодіод, що детектує будь-яке розсіяне світлове випромінювання (звичайно цього цілком досить для відстеження флуктуації енергії). Вихідний сигнал фотодіода подається також в електронний модуль, де здійснюється корекція з поправкою на енергію сигналів флуоресценції і розсіяного в зворотному напрямку світла.

Поверхнева густина потоку (сонячного) випромінювання (ФАВ) у місці розташування системи має безпосереднє відношення до інтерпретації інтенсивності флуоресценції молекул хлорофілу. Тому в не затемненому місці слід установити ще один ФАВ-давач, розмістивши його вище від рослинного покриву. ФАВ-сигнал давача флуоресценції (встановленого всередині рослинного покриву), реєстрований електронними схемами детектування (у конкретних діапазонах довжин хвиль і без збудження, тобто фоновий сигнал), служить як додаткове джерело інформації при наступній обробці сигналу або використовується в алгоритмах, застосовуваних у роботі мікроконтролера.

Для правильної інтерпретації даних про флуоресценцію рослин часто потрібно знати, де проводилися вимірювання (розташування давача над рослинним покривом або всередині нього). Тому, якщо система детектування флуоресценції використовується в сільському господарстві (наприклад, установлена на транспортному засобі), то вона повинна бути певним чином зорієнтована щодо верхнього рівня рослинного покриву. Положення верхнього рівня рослинного покриву безперервно контролюється за допомогою переміщуваної у вертикальному напрямку світлової смуги, зорієнтованої горизонтально щодо поверхні рослинного покриву. Положення світлової смуги, а тим самим і положення детектора флуоресценції змінюються за рахунок їхнього переміщення у вертикальному напрямку відповідно до коефіцієнта заповнення (імпульсної послідовності). Коефіцієнтом заповнення, що дорівнює кількості переходів від затінених чи затемнених ділянок до освітлених ділянок і навпаки за інтервал часу, що відповідає тривалості сигналу світлової смуги, визначається напрямком переміщення світлової смуги вниз чи вгору. При налаштуванні коефіцієнта заповнення потрібно враховувати швидкість руху транспортного засобу. Якщо коефіцієнт заповнення менший від певного заданого числа (у припущенні, що при розташуванні давача над рослинним покривом перехід від затіненої або затемненої ділянки до освітленої ділянки і навпаки не відбувається), то давач повільно переміщають униз доти, доки коефіцієнт заповнення не перевищить максимального значення. Як приводи для вертикального переміщення вузла, складеного з генератора світлової смуги і давача, можна використовувати гідравлічні, пневматичні або механічні пристрої.

Вимірюючи за допомогою описаної вище апаратури відносне розташування верхнього рівня рослинного покриву, можна визначити його абсолютну висоту, якщо відома відстань від давача до землі.

Промислова застосовність винаходу

Нижче розглянуто пристрій, призначений для виявлення хлорофіловмісних рослин або рослинних органів і роботизованої ідентифікації рослин.

Пристрій для виявлення зеленої рослинності (яка характеризується наявністю хлорофілу) можна реалізувати з використанням одного джерела збудження, оптимально діодний лазер, що генерує випромінювання з довжиною хвилі 670нм, і один детектор (ФЕУ або діод) з інтерференційним світлофільтром, що пропускає випромінювання з довжиною хвилі в діапазоні від 680 до 740нм і має спектральну ширину смуги пропускання від 5 до 25нм.

При використанні описаної вище електроніки, призначеної для оперативного детектування й оперативної автоматичної корекції з поправкою на фонові сигнали, давач може працювати при повному сонячному світлі. Задавши прийнятну граничну величину сигналу, рослинність можна ідентифікувати без подальшої обробки цього сигналу. У цьому діапазоні довжин хвиль (у природних умовах) сигнал флуоресценції формується практично тільки молекулами хлорофілу. При цьому контраст між рослинними і нерослинними мішенями надзвичайно великий. При цьому немає потреби контролювати енергію збуджувального випромінювання й умови освітленості в місці виростання рослини. Місце виростання рослини визначається положенням і орієнтацією детекторної голівки, що відомі заздалегідь.

Таку систему детектування можна використовувати в таких цілях:

як стежні системи для робототехнічних пристроїв, використовуваних у тепличному господарстві або в садівництві,

як системи виявлення рослин (бур'янів) з наступним їхнім знищенням; така сенсорна система становить інтерес з погляду швидкої і безперервної ідентифікації бур'янистої рослинності, що виростає на залізничному полотні, і для оперативного очищення залізничного полотна від такої рослинності шляхом оброблення спеціальними хімікатами, гарячою водою і т.ін.

Застосування в першому з розглянутих випадків становить інтерес у поєднанні з будь-яким давачем відстані або системами тривимірного моніторингу місцевості, оскільки при цьому стає можливим визначити, є мішень зеленою рослинністю (рослиною) чи ні.

Переважа цього методу виявлення рослин підтверджується тим фактом, що в ньому не потрібне застосування систем розпізнавання образів або спектрального аналізу.

Нижче розглянуто пристрій для визначення концентрацій хлорофілу.

У першій модифікації описаної вище системи створюється можливість визначати відносні зміни (хронологічний або локальний розподіл) концентрації хлорофілу за листовою площею. Для реалізації цього до базової конфігурації системи додається другий вимірювальний канал, як це описано вище. Для детектування використовуються спектральні смуги в діапазоні $680-690 \pm 5\text{ нм}$ і $720-740 \pm 5$ чи 10 нм . Сигнали флуоресценції коректуються в оперативному режимі з урахуванням фонових сигналів (пасивний сигнал) і потім скоректовані на фон сигнали діляться один на одного. Множення отриманого відношення на калібрований коефіцієнт, характерний для досліджуваних рослин, дозволяє одержати абсолютні значення концентрації хлорофілу:

$$\frac{S_{\lambda 1(\text{активн.})} - S_{\lambda 1(\text{пасивн.})}}{S_{\lambda 2(\text{активн.})} - S_{\lambda 2(\text{пасивн.})}} \cdot C_{\text{калібровка}} = C_{\text{хлорофіл}}$$

Слід зазначити, що використовувані для калібрування значення залежать від адаптації рослин до світла. Якщо рівень навколишньої освітленості змінюється таким чином, що рослини переходять з адаптованого до світла до адаптованого до темноти фотосинтетичного стану і навпаки, то використовувані для калібрування значення можуть виявитися помилковими.

Система в такій конфігурації може знайти застосування, наприклад, для роботів, використовуваних у теплицях, коли для визначення стадії росту (розвитку) чи умов довгострокового стресу рослин з її допомогою реєструється рівень хлорофілу. Такий же підхід застосовний також щодо будь-якого хлорофіловмісного матеріалу, наприклад щодо хлорофіловмісних епідермальних шарів шкірочки плодів у процесі їхнього розвитку. Так, зокрема, можна визначати стиглість плодів, коли останні втрачають свій типовий зелений колір (наприклад вишні, банани, яблука, горіхи і т.ін.). Контроль концентрації хлорофілу по флуоресценції дозволяє також стежити за псуванням свіжих плодів (якщо в їхній шкірці або шкірочці є хлорофіл) і за розвитком рослин, якщо їхнє старіння (наприклад час збереження) супроводжується хлорозом (розпадом хлорофілу на хімічні фрагменти). Як приклад можна назвати огірки, деякі типи яблук або листя салату.

Нижче описано пристрій, що дає змогу керувати спрямованим унесенням добрив.

Відомо, що концентрація хлорофілу в листі залежить і тим самим корелює з концентрацією азоту і сірки у всій рослині. Нестача живильних речовин, унесених з добривами, виявляється в характерному зниженні концентрації хлорофілу (за винятком азотних добрив, внесених у дозі, що перевищує рівень насичення). У пшениці такий вплив добрив є специфічним щодо тих чи інших живильних речовин, які оптимально локалізуються або у верхніх (азот), або в нижніх (сірка) шарах листя рослинного покриву.

При внесенні добрив у різних дозах спостерігається також два інших ефекти. По-перше, прискорюється ріст рослин (збільшуються розміри рослини), а по-друге, у рослин виявляються деякі характерні зміни в утворенні біомаси й у щільності стояння рослин (пов'язаної з густотою листового покриву).

Для контролю всіх цих параметрів можна використовувати передбачливий підхід, що також базується на використанні описаного вище двоканального флуорометричного давача з діодним лазером. При цьому детекторну голівку встановлюють на рухомій механічній руці, яка монтується на переміщуваній платформі (наприклад на транспортному засобі). Вертикальне положення руки регулюється описаною вище світловою смугою, що визначає фактичне положення "поверхні" усього рослинного покриву. У результаті можна легко визначити абсолютну висоту рослинного покриву, якщо відома початкова висота розташування детектора щодо землі. Детекторна голівка встановлюється у певне положення щодо рівня цієї поверхні або періодично переміщається в якому-небудь напрямку в межах відстані між землею і рівнем цієї поверхні. Такий періодичний рух може являти собою вертикальне зворотно-поступальне переміщення або обертання на диску, що крутиться. З урахуванням горизонтального руху платформи-носія (трактора) можна одержувати дво- або при обертанні тривимірний профіль, що відображає наявність чи відсутність рослинності (реєстрація сигналу флуоресценції за принципом ТАК/НІ, тобто за принципом наявності/відсутності сигналу флуоресценції), а також одержувати дані про концентрації хлорофілу (співвідношення сигналів двох вимірювальних каналів детектування флуоресценції). Попередньо визначені для кожного процесу вимірювання дані про положення, дані про висоту рослинного покриву і параметри листів у сукупності дозволяють розрахувати всі розглянуті вище показники рослинного покриву, а саме його висоту і густоту і концентрацію хлорофілу, а також розподіл цих показників по двох чи трьох координатах у межах вертикального аналізованого шару, відповідно в межах вимірювального обсягу.

Нижче описано пристрій, що дозволяє відрізнати одночасткові рослини від двочасткових з метою регульованого внесення гербіцидів для селективної боротьби з бур'янами.

У тих випадках, коли бур'яни є єдиними рослинами на якій-небудь відведеній під сільськогосподарські культури площі чи на садовій ділянці (наприклад з появою бур'янів ще до початку росту культурних рослин), для належної обробки досить знати точне місце розташування рослин. У цих цілях досить використовувати систему в базовій конфігурації, доповненій сканером.

Якщо обидва види рослин виростають одночасно на тій самій ділянці (конкуруючи один з одним), то бур'яни потрібно відрізнати від культурних рослин. У багатьох випадках ці типи рослин підрозділяються на одночасткові (ОЧ) і двочасткові (ДЧ) рослини, що дозволяє застосовувати селективні гербіциди.

При дослідженні спектрів флуоресценції в діапазоні довжин хвиль від 400 до 750 нм було встановлено, що ДЧ-рослини звичайно характеризуються значно менш інтенсивною синьою флуоресценцією в порівнянні з ОЧ-рослинами. Така властивість і використовується для розрізнення рослин цих двох типів.

Для ефективного збудження синьої флуоресценції в систему потрібно додати додаткове джерело збудження. Було встановлено, що ідеальним джерелом є лазер, що генерує випромінювання з довжиною

хвилі близько 400нм. Більш короткохвильове збуджувальне випромінювання поглинається в основному верхніми шарами листя і в результаті не збуджує з достатньою мірою ефективності фотосистеми (червону флуоресценцію). При цьому тільки джерела випромінювання з довжинами хвиль близько 400нм досить ефективно збуджують і синю, і червону флуоресценцію, і тому такі джерела найдоцільніше використовувати в усій системі в цілому, хоча в даний час їх немає на ринку. Проте цю проблему можна вирішити за рахунок одночасного використання двох збуджувальних лазерів. Для цього можна використовувати компактний лазер на ітрій-алюмінієвому гранаті з неодимом (Nd:YAG-лазер), що працює на довжині хвилі 355нм, або будь-який інший лазер, що генерує УФ-випромінювання, а для збудження червоної флуоресценції в системі є червоний діодний лазер. У цьому випадку потрібно проводити взаємне калібрування обох джерел збудження, щоб нормувати інтенсивності флуоресценції, що є обов'язковою умовою для інтерпретації даних про співвідношення інтенсивностей флуоресценції.

На приймальному боці потрібно встановити принаймні один додатковий детекторний модуль, настроєний на роботу в діапазоні довжин хвиль від 430 до 460нм (ширина смуги пропущення не має істотного значення і може становити від 10 до 50нм). Четвертий детекторний модуль може контролювати сигнал флуоресценції на довжині хвилі, що лежить у зеленій ділянці спектра, оскільки завдяки характерній флуоресценції (у цьому діапазоні довжин хвиль), властивій деяким типам рослинності, можливе ефективне розпізнавання рослин.

Призначена для роботи у відкритому полі система повинна являти собою в цьому випадку сканувальну систему, монтовану (як і для контрольованого внесення добрив) на механічній руці, яка встановлюється в положення, відрегульоване щодо одночасно контрольованого верхнього рівня рослинного покриву.

Співвідношення зареєстрованих інтенсивностей флуоресценції F_{400+} х(синя) - F_{680+} х(червона) і F_{500+} х(зелена) - F_{680+} х(червона) інтерпретуються з урахуванням умов навколишнього освітлення, оскільки інтенсивність червоної флуоресценції на відміну від синьої/зеленої флуоресценції залежить від стану реакційних центрів.

Для визначення густота бур'янів або - при скануванні по всій площі земельної ділянки - для одержання точних даних про розподіл рослин по поверхні (типи рослин [X, Y, Z]) використовується порівняння з заданими (каліброваними) граничними значеннями для спектральних характеристик. Ця інформація про розташування рослин передається в керівний пристрій системи знищення бур'янів.

Нижче розглянутий пристрій, що дає змогу виявляти зараження різними фітопатогенними грибами і керувати обробкою фунгіцидами.

Для виявлення зараження фітопатогенними грибами потрібна система з двома джерелами збудження з відповідним другим вимірювальним каналом для детектування випромінювання флуоресценції в другій смузі червоної ділянки спектра й один детектор сигналу пружно розсіяного в зворотному напрямку світла на довжинах хвиль 355 чи 670нм. У функції останнього можна використовувати простий фотодіод завдяки високому очікуваному рівню сигналу в порівнянні із сигналом флуоресценції.

Така система дозволяє контролювати цілий ряд різних взаємодій грибів з рослинами.

Вплив на фотосинтезувальну систему можна розпізнати по зміні фотосинтетичної активності, яка виявляється в зміні інтенсивності флуоресценції в одному з вимірювальних каналів детектування червоної флуоресценції. Подібний представник грибкової інфекції такого типу вже був виявлений при зараженні рослин борошнистою росою, коли вплив грибів на ранній стадії їхнього розвитку на фотосинтезуючу систему виявляється в істотному уповільненні її реакції у відповідь на збуджувальне випромінювання в кінетиці Кауцького.

Зараження грибами може спричиняти зміни в морфологічній структурі листя, до повного руйнування чи клітин до змін у складі пігментів рослини. Такі морфологічні зміни (а отже, і зміни оптичних властивостей листів) або зниження вмісту хлорофілу визначаються за співвідношенням сигналів у вимірювальних каналах детектування смуг випромінювання червоної флуоресценції. Так, зокрема, при нерівномірному ураженні грибами (наприклад при зараженні іржею) можна визначати розподіл грибів по всій поверхні листя, що дозволяє проводити аналіз з використанням додаткових (кількісних) ідентифікаційних критеріїв.

Зміни в складі пігментів, що випускають синю і/або зелену флуоресценцію (СЗ), виявляються за характеристиками сигналів у вимірювальних каналах у цих ділянках спектра. Такий підхід буде настільки ж успішним, як і при ідентифікації бур'янів, якщо припустити, що рослинний покрив утворений рослинами однієї культури. Крім того, деякі гриби (наприклад борошниста роса) самі є джерелами характерної СЗ-флуоресценції, і тому їх можна виявляти чи безпосередньо навіть ідентифікувати за спектральними характеристиками їхньої СЗ-флуоресценції.

Борошниста роса на пізній стадії розвитку покриває поверхню листя додатковим шаром тканин, що дає йому характерний білястий колір. У результаті відбивна здатність листя істотно зростає, що можна визначити за сигналом пружно розсіяного в зворотному напрямку світла на довжинах хвиль збуджувального випромінювання в червоній або в УФ-ділянках спектра.

Крім цього система детектування флуоресценції, коли вона змонтована на рухомій у вертикальному напрямку (а можливо і рухомій у трьох напрямках) механічній руці, дозволяє визначати розподіл грибів на уражених рослинах у вертикальному напрямку, що також характерно для грибів деяких типів.

У принципі ідентифікувати гриби всіх типів, які паразитують на рослинах, неможливо, однак за певних умов кількість таких грибів обмежена, і тому розглянутий вище підхід дозволяє застосовувати таку систему як систему раннього попередження про ураження рослин грибами або як стежний пристрій системи захисту рослин.

На закінчення розглянуто пристрій, що дає змогу контролювати фотосинтетичну активність рослинності при циклічному чи періодичному проведенні вимірювань.

У цьому варіанті в системі детектування передбачена інтерпретація даних про інтенсивність флуоресценції молекул хлорофілу. Її технічна реалізація залежить від вимог, ставлених до вимірювань. Така інтерпретація може полягати в простому порівнянні відносних змін інтенсивностей флуоресценції, нормованих на відносний вміст хлорофілу, або в більш досконалому, але разом з тим і більш складному визначенні

здатності до фотосинтезу, як це має місце, наприклад, при використанні кінетики Кауцького або АІМ-флуорометрії.

Вимірювати відносні зміни можна як у просторі, так і в часі. В обох випадках система з погляду апаратного забезпечення аналогічна до системи в базовій конфігурації, однак алгоритм інтерпретації змінюється на такий:

$$\left[1 / \frac{S_{\lambda 1(\text{активн.})} - S_{\lambda 1(\text{пасивн.})}}{S_{\lambda 2(\text{активн.})} - S_{\lambda 2(\text{пасивн.})}} \right] \cdot (S_{\lambda 2(\text{активн.})} - S_{\lambda 2(\text{пасивн.})}) = \text{ВФА}$$

У наведеній вище формулі ВФА означає відносну фотосинтетичну активність. Передбачається, що матеріал мішені розподілений однорідно. ВФА априорі залежить від часу і геометричного місця розташування, тобто ВФА ($t; x, y, z$). Таким чином, відповідний експеримент слід проводити при контрольованих навколишніх умовах. Наявність ФАВ-давача дозволяє одержати інформацію про умови навколишнього освітлення поблизу детекторної голівки, на які не повинен впливати матеріал мішені (не затінювати або не освітлювати відбитим світлом).

Це пристрій можна використовувати в тих випадках, коли потрібно контролювати стан рослин, тобто їхню життєздатність, стан здоров'я і т.ін. Однією з можливих цілей застосувань є дослідження довгострокових процесів, коли спостерігають вплив змінних навколишніх умов на рослину-зразок (або набір зразків) з добре визначеними параметрами. Інша мета застосування може полягати в дослідженні великої кількості мішеней при контрольованих умовах освітленості, наприклад у теплиці або лабораторії.

Для визначення більш складних кінетичних параметрів фотосинтезу вимоги до умов освітленості є більш строгими. Кінетику Кауцького, а тим самим і всі відповідні параметри можна вимірювати тільки на рослинах, адаптованих до темноти, тобто в нічний час або в лабораторії. При проведенні таких вимірювань пляма збудження повинна бути нерухома, щоб можна було спостерігати реакцію у відповідь на вплив активним світлом у часі. Джерелом активіюючого світла може служити саме джерело збудження, якщо частота повторення імпульсів збільшена до рівня, при якому середня освітленість ініціює активіюючу (фотохімічну) реакцію. Активіюючу реакцію можна викликати також, увімкнувши додаткове джерело білого світла, що своїм спектральним складом близьке до ідеального білого світла, і опромінюючи таким шляхом рослину безперервним потоком фотонів починаючи з деякого точно заданого моменту часу. У першому варіанті ($S_{\lambda(\text{пасивн})}=0$) аналіз зводиться до арифметичної обробки сигналів флуоресценції. Другий варіант також не вимагає яких-небудь технічних змін, оскільки пасивний сигнал ($S_{\lambda(\text{пасивн})} \neq 0$) повністю контролюється системою.

З АІМ-флуорометрії відомо, що так званий "показник Женті" (Genty) (ПЖ) є прийнятною мірою квантового виходу асиміляції CO_2 . Показник Женті можна одержати, вимірюючи сигнал флуоресценції у стані сталості (позначуваної F_s), а також сигнал флуоресценції у стані сталості, на який накладено насичувальний світловий імпульс (позначуваний F_m'):

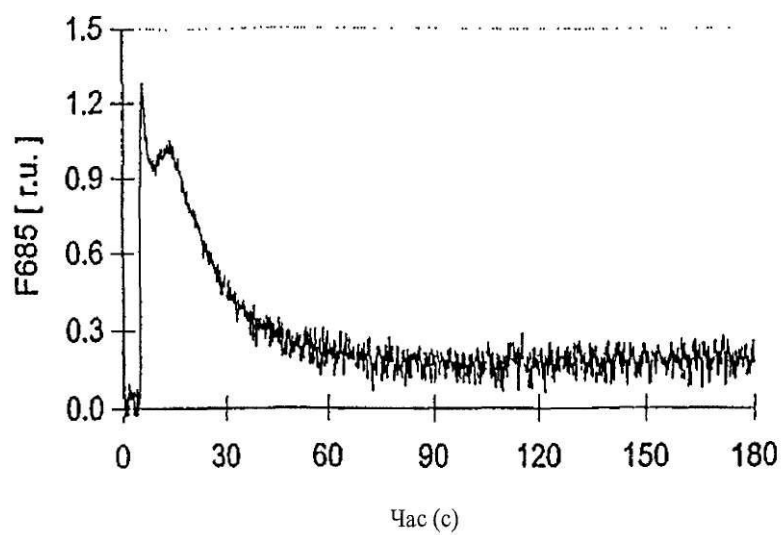
$$\frac{(F_m' - F_s)}{F_m'} = \text{ПЖ}$$

Високе значення ПЖ указує на інтенсивний потік електронів у ланцюзі їхнього переносу, тоді як низькі значення можуть указувати на наявність порушень у фотосинтезувальній системі, якщо флуоресценція вимірюється при тих самих навколишніх умовах (насамперед при одній і тій же силі світла, відповідно інтенсивності освітлення).

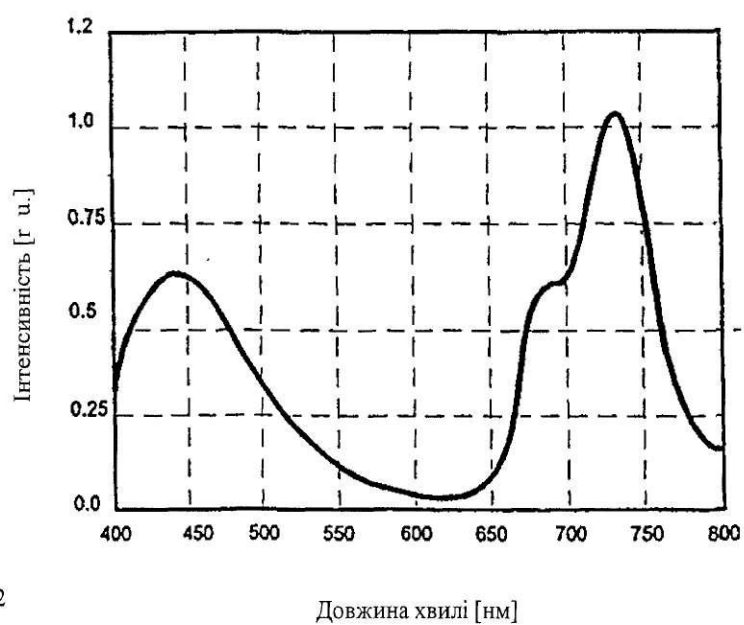
Стала флуоресценція (F_s) збуджується дистанційно діодним лазером, тоді як додаткова лампа білого світла або сонячне світло служать джерелами активіюючого світла. Імпульс F_m' генерується додатковим сильним джерелом світла (імпульсною лампою).

Завдяки наявності ФАВ-давача і детектуванню пасивного фоновому сигналу така система детектування флуоресценції уможливорює контроль і вимірювання сигналів F_s і F_m' . Таким чином, ПЖ можна контролювати як функцію енергетичної освітленості, що відбиває асиміляцію CO_2 , без використання якого-небудь устаткування для газового аналізу. Переключення між активіюючим і насичувальним світлом оптимально здійснювати шляхом модуляції того самого джерела, переключаючи його з режиму безперервного фоновому освітлення на імпульсний режим, у якому генеруються світлові імпульси для освітлення потоком високої інтенсивності тривалістю в декілька мілісекунд.

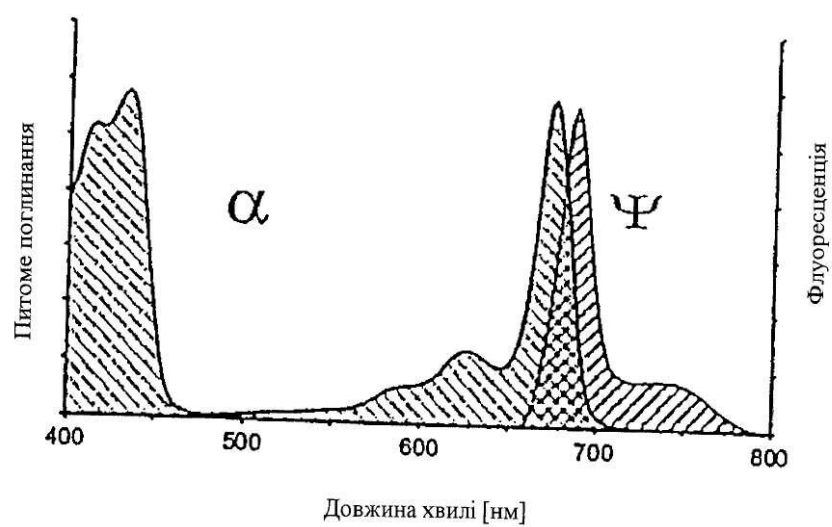
На основі пропонованої у винаході системи розроблено новий методичний підхід до вимірювання добре відомих фізіологічних параметрів рослин за певних умов з найбільш точним визначенням відповідних умов вимірювання і навколишніх умов.



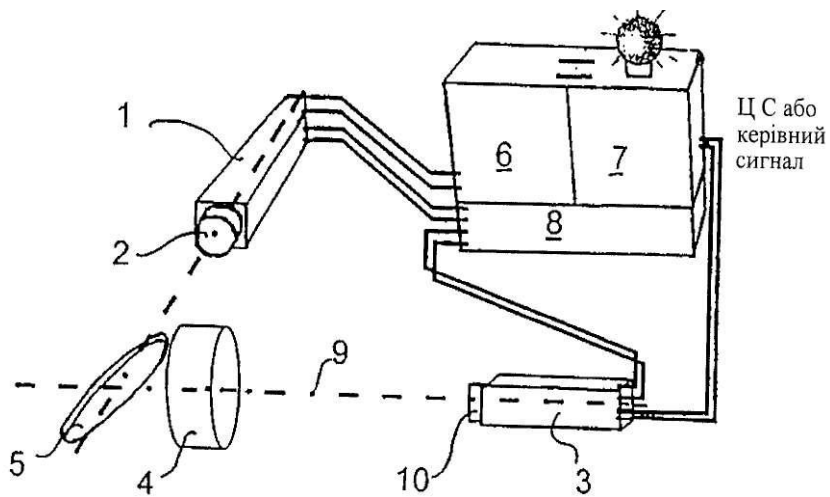
ФІГ. 1



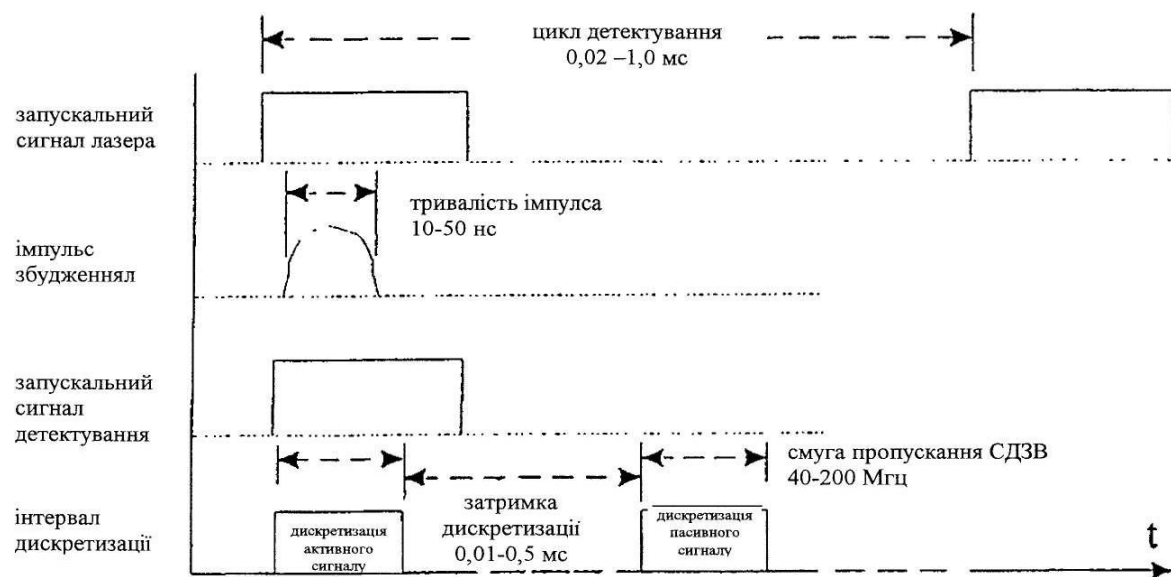
ФІГ. 2



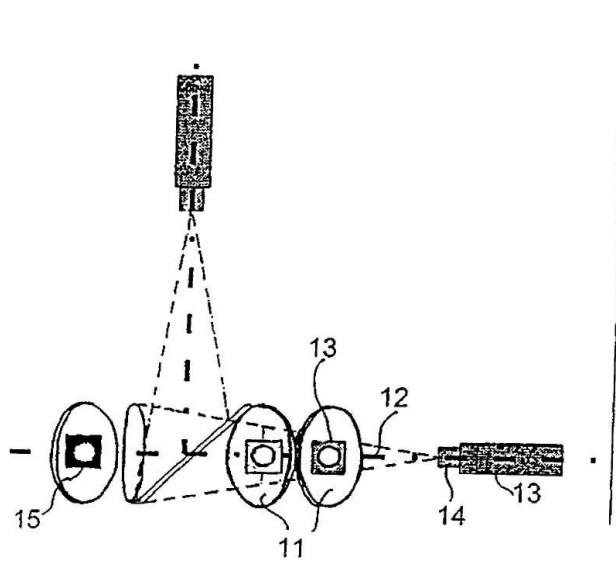
ФІГ. 3



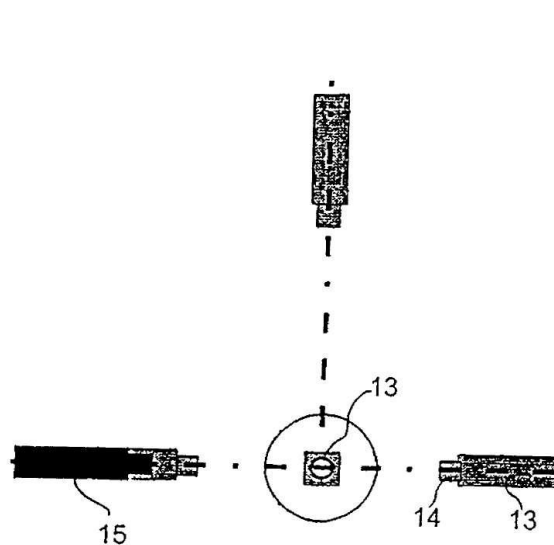
ФІГ. 4



ФІГ 5



ФІГ. 6а



ФІГ. 6б