基于激光激发叶绿素荧光分析的叶片水分利用效率模型*

隋媛媛　于海业　杨昊谕　张　蕾　周　亮
（吉林大学生物与农业工程学院，长春 130025）

【摘要】 以无损检测为前提，采用激光为激发光源，对杨树活体叶片进行荧光光谱采集，对采集到的光谱数据进行处理分析得到水分利用效率的荧光光谱敏感波段，建立基于叶片温度修正下的植物水分利用效率与荧光光谱的数学回归模型，模型的复相关系数 $R^2=0.975$。并对建立的数学回归模型进行效果检验，相关系数 $r=0.8746$，模型的检测效果较好。

关键词：水分利用效率　荧光光谱　无损检测　数学模型
中图分类号：S123　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-1298(2011)03-0188-04

Model of Water Use Efficiency of Leaves Based on Laser Induced Chlorophyll Fluorescence Analysis Technique

Sui Yuanyuan　Yu Haiye　Yang Haoyu　Zhang Lei　Zhou Liang
(*School of Biological and Agricultural Engineering*, *Jilin University*, *Changchun* 130025, *China*)

Abstract

Based on non-destructive detection, the fluorescence spectrum of living leaves of poplar was collected by laser as excitation light source. Sensitive fluorescence spectrum band of water use efficiency was arrived through analyzing spectrum data. A model depending on the modification of leaves temperature was established. The functional relation between water use efficiency and fluorescence spectrum was described and the multiple correlation coefficients R^2 were 0.975. The correlation coefficient r between calculated values and measured values was 0.8746 by verification test.

Key words　Water use efficiency, Fluorescence spectrum, Non-destructive detection, Mathematical model

引言

植物的水分状况影响着农作物的产量和林木的生长，而水分利用效率能够更好地表征这一现象。快速定量地掌握生物体的水分状况，能更好地了解生物体的健康状况。国外有人研究鹰嘴豆在不同的播种日期和不同水平的水分胁迫下作物产量与水分利用效率的关系，并建立了回归方程[1]。水分利用效率用来描述植物产量与所消耗水量之间的关系[2]。国内外对水分利用效率的研究表明，在一定的水分供应条件下，水分利用效率高的植物可以更多地转化干物质，有利于其生长[3]。

叶绿素荧光被视为研究植物的无损探针，通过叶绿素荧光可以检测植物的生长状态，实现植物生命信息的无损、实时、准确获取。植物的叶绿素荧光有两种形式，即叶绿素荧光动力学和荧光光谱。前者已有人进行了相关的研究，发现玉米自交系叶片水分利用效率与叶绿素 a 荧光参数呈极显著的正相关关系，可以将叶绿素荧光参数作为选育高水分利用效率玉米自交系的标准[4]。而荧光光谱在各个波段不同的荧光强度可以更为具体地反映植物内在的营养信息。

收稿日期：2010-04-09　修回日期：2010-05-07
* 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2007AA10Z203)
作者简介：隋媛媛，博士生，主要从事植物生理信息检测及农业生物环境研究，E-mail：suiyuan0115@126.com
通讯作者：于海业，教授，博士生导师，主要从事植物生理信息检测及农业生物环境研究，E-mail：haiye@jlu.edu.cn

叶绿素荧光光谱的测量是基于植物叶片尺度，以无损检测为前提，了解植物的生长状况。尤其是在防护林选苗定植时，通过对其水分利用效率的检测，可以预测植物的干物质积累能力，提高定植的成活率。本文从叶绿素荧光光谱分析的角度研究叶片水分利用效率与荧光光谱之间的关系。采用杨树为研究树种，以激光激发叶绿素荧光反射光谱技术为手段，通过对杨树活体叶片的光谱采集研究杨树叶片的水分利用效率情况，最终建立水分利用效率与荧光光谱的数学模型，并通过数学模型来反演杨树叶片的水分利用效率情况，以达到了解植物生长状况的目的。

1　实验

1.1　实验材料与检测仪器

本研究于长春市吉林大学南岭校区进行。实验材料选择东北地区普通树种毛白杨（一年生树木），选取在自然光照射下无遮阴、生长健康、叶面积大小较为均匀的活体叶片。光谱数据的采集点及其他仪器的测定点均为主叶脉的一侧、叶片的中央位置。

植物水分利用效率的测定采用美国生产的 CI－310 型便携式光合作用测定系统。采用固体激光器作为荧光的激发光源，经研究表明[5]，输出波长为 473 nm、输出功率为 7.5 mW 的光源是黄瓜叶片检测的最佳光源。光谱数据的采集选择荷兰生产的 AvaSpec－2048－USB2 型光纤光谱仪，可测光谱范围为 360～1 100 nm，VA 光栅线对数为 300 线/mm，分辨率 4.3 nm，采样积分时间 1.1 ms。荧光接收探头与激光成 45°贴近叶片表面。测量过程如图 1 所示。

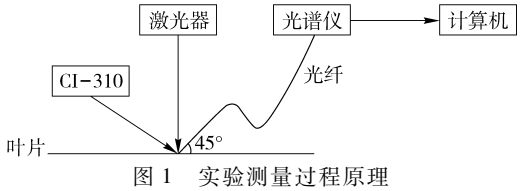

图 1　实验测量过程原理

Fig. 1　Summary of measure process in test

1.2　实验测定时间

植物叶片的水分利用效率会随着环境因素的变化而变化。国外有研究表明，植物的水分利用效率有日变化和季节性变化两种形式，季节性的变化峰值出现在 7～8 月，日变化的峰值出现在早晨[6]。本研究于 2009 年 8 月 17～21 日集中选择在晴朗无风的天气中进行，每天 8:00 开始。

1.3　叶片样品选取与数据计算

选取的杨树叶片，其含水率均在 68%～72% 之间。叶片含水率的计算公式为

$$V = \frac{W - M}{W} \times 100\%$$

式中　V——叶片含水率，%

W——鲜叶质量　　M——干叶质量

水分利用效率的公式为

$$W_{UE} = \frac{P_n}{T_r}$$

式中　W_{UE}——水分利用效率

P_n——光合速率　　T_r——蒸腾速率

2　结果与讨论

2.1　光谱敏感波段的确定

通过对叶片水分利用效率的测定和激光激发荧光光谱的采集，得到了叶片的水分利用效率和与之相对应的叶绿素荧光光谱，如图 2 所示。

从图中能明显地看到，在输出波长为 473 nm 的激光激发下，不同叶片水分利用效率在 510～514、640～715、715～840 nm 3 个波段均出现了荧光强度的峰值。而在 510～514 nm 波段的荧光强度峰值有谱图的交叉现象，在 640～715 nm 波段荧光谱图有重叠现象，因此这两个波段都不宜作为叶片水分利用效率与荧光光谱关系研究的波段；而在 715～820 nm波段产生的荧光强度波峰值更能清晰且有规律性地表现叶绿素的荧光光谱随叶片水分利用效率的变化情况。因此选取 715～820 nm 波段进行研究。

通过对不同水分利用效率的典型叶片进行光谱采集时发现，水分利用效率低的叶片所得到的荧光强度要大于水分利用效率高的叶片。以此为根据，进行叶片水分利用效率与叶绿素荧光强度关系的研究。

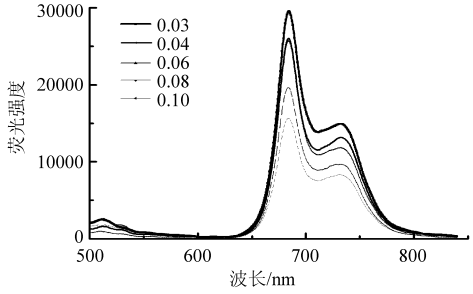

图 2　叶绿素荧光光谱与叶片水分利用效率关系

Fig. 2　Relation of chlorophyll fluorescence spectrum of leaves and water use efficiency

分别采集 510～514、640～715、715～840 nm 3 个波段的荧光强度峰值 F512、F685、F734（F512、F685、F734 分别表示荧光峰值处的中心波长为 512、685、734 nm），并对 F512、F685、F734 与叶片的水分利用效率进行线性拟合，得到的决定系数 R^2 分别为

0.057 3、0.743 1、0.920 3。

通过以上分析,宜采用荧光强度 F734 研究杨树叶片水分利用效率。

2.2 叶片水分利用效率与叶绿素荧光强度和叶片温度的关系

2.2.1 叶绿素荧光强度

选取 45 片生长健康、叶面积较为均匀的杨树活体叶片进行水分利用效率的测定和叶绿素荧光光谱的采集,以 F734 为主要研究对象,将得到的数据进行标准化、平滑去噪处理后,建立基于叶片尺度测量下的线性回归方程,得到的结果如图 3 所示,线性拟合方程为

$$Y = -0.959\,3X + 4\times10^{-16}$$

式中 Y——叶片水分利用效率

X——叶绿素荧光强度

决定系数 $R^2 = 0.920\,3$,在 0.01 水平下显著相关。

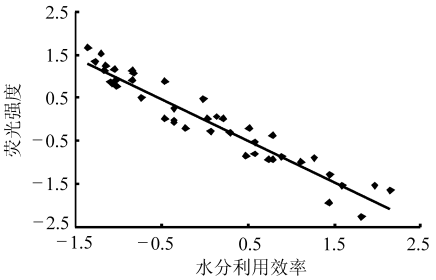

图 3 叶片水分利用效率与叶绿素荧光强度关系

Fig. 3 Relation of water use efficiency and chlorophyll fluorescence spectrum intensity of leaves

2.2.2 叶片温度

叶片的水分利用效率是由植物本身的光合速率和蒸腾速率决定的,CO_2 的吸收和水分的输出都受到细胞气孔开度的影响,而叶片温度则是细胞气孔开度的信号,一般气孔开度会随温度的升高而增大,在 30℃左右达到最大,高温会使气孔开度变小[7]。因此叶片温度对叶片进行的光合作用和蒸腾作用都存在着一定的影响。

对上述叶片温度与水分利用效率数据的研究发现,二者在 0.01 水平显著相关,决定系数为 $R^2 = 0.836\,1$。基于叶片尺度测量下的拟合方程为

$$Y = 0.003\,3X' - 0.053\,8$$

式中 X'——叶片温度,℃

2.3 基于叶片温度修正的叶片水分利用效率与叶绿素荧光光谱模型

基于 2.2 节的研究,叶片水分利用效率与叶绿素荧光光谱和叶片温度都存在着极显著的相关性,因此将叶片温度也作为荧光水分模型的一个因素。对 45 个样本叶片经均值为 0、标准差为 1 的数据标准化处理后,用最小二乘法确定回归系数,最终建立基于叶片尺度测量下的多元线性模型为

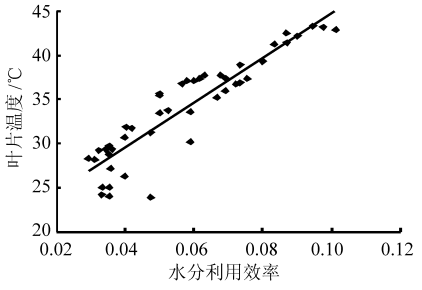

图 4 叶片水分利用效率与叶片温度关系

Fig. 4 Relation of water use efficiency and temperature of leaves

$$Y = -0.666X + 0.34X'$$

复相关系数 $R^2 = 0.975$,0.01 水平显著相关。

2.4 模型的验证

另外挑选同批进行实验的 30 片杨树叶片作为回归方程的校验集,经过均值为 0、标准差为 1 的标准化处理后,得到预测值与实测值关系的散点图,如图 5 所示,相关系数 $r = 0.874\,6$,两组数据在显著性水平为 0.05 水平上差异不显著。

对两组数据进行分析,得到真实值的标准偏差和相对标准偏差分别为 0.979 3 和 0.114 3;预测值的标准偏差和相对标准偏差分别为 0.912 4 和 0.365 7。

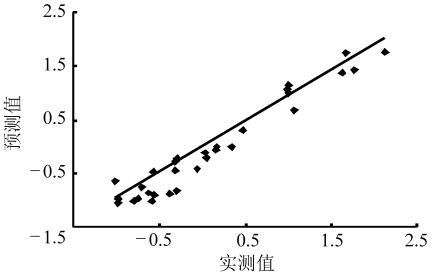

图 5 模型校验集预测值与实测值关系

Fig. 5 Relation of predicted and real value in validation set of model

通过以上分析,认为模型的预测性能较好,能够反映经过叶片温度校正后水分利用效率与叶绿素荧光强度之间的关系,为荧光光谱无损检测植物生理状况提供了理论依据。

2.5 机理分析

植物光合作用分为光反应和暗反应两个阶段,光反应又分为光反应 I(PSI)和光反应 II(PSII)两个部分,而荧光强度峰值(F734)是由 PSI 发射的。PSI 过程中在铁氧还蛋白 NADP 还原酶(Fp)作用下完成非循环电子传递,反应式为

$$2ADP + 2Pi + 2NADP^+ + 2H_2O \xrightarrow{光} 2ATP + 2NADPH + O_2$$

这个过程完成水裂解放出氧气,同时将光能转

化成光合作用所需的能量，水分的利用与植物光能的转化呈正相关关系，随着水分利用的增多，转化成光合作用所需要的能量也越多，因此在能量一定的情况下，PSI 反应所放出的能量下降，导致 F734 荧光强度随着叶片水分利用效率的上升而下降。

在实验中选择含水率为 68% ~72% 的叶片，即能满足叶片正常的生理需求。而植物体从外界所获得的能量是一定的，获得的能量被光合作用、热辐射和叶绿素荧光竞争分配[8]，光合作用可以用光合速率来表征，在叶片中热能的散失可以用叶片温度来表征，而在能量一定的情况下，光合作用和热辐射所需要的能量增加，必然会导致叶绿素荧光的降低，体现在荧光光谱上，导致光谱强度的下降。所以，从能量传递的角度上考虑该模型的研究是合理且可信的。

3　结束语

本文从植物无损检测的角度出发，以 473 nm 激光激发活体叶片荧光光谱为手段，建立了在叶片温度修正下的叶片水分利用效率与叶绿素荧光光谱数学回归模型，复相关系数 $R^2 = 0.975$，回归效果极显著。并对得到的模型进行效果检验，得到相关系数 $r = 0.8746$。该模型可以较为有效地反映叶片水分利用效率与叶绿素荧光光谱强度之间的关系，为植物的无损检测提供参考依据。

参　考　文　献

1　Oweis Theib, Ahmed Hachum, Mustafa Pala. Water use efficiency of winter-sown chickpea under supplemental irrigation in a mediterranean environment[J]. Agricultural Water Management, 2004, 66(2):163 ~ 179.

2　Kramer P J, Kozlowski T T. Physiology of woody plants [M]. London: Academic Press, 1979: 443 ~ 444.

3　李荣生，许煌灿，尹光天，等. 植物水分利用效率的研究进展 [J]. 林业科学研究, 2003, 16(3):366 ~ 371.
Li Rongsheng, Xu Huangcan, Yin Guangtian, et al. Advances in the water use efficiency of plant [J]. Forest Research, 2003, 16(3):366 ~ 371. (in Chinese)

4　于晓芳，高聚林，宋国栋，等. 玉米叶片水分利用效率与叶绿素 a 荧光参数的关系[J]. 玉米科学, 2009, 17(4): 55 ~ 57,60.
Yu Xiaofang, Gao Julin, Song Guodong, et al. The relevant between the leaves WUE of maize inbred lines and the kinetic parameter of fluorescence in chlorophyll a [J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(4):55 ~ 57, 60. (in Chinese)

5　杨昊谕，于海业，张蕾，等. 基于激光诱导荧光光谱分析的黄瓜叶片叶绿素含量检测 [J]. 农业机械学报, 2009, 40(10):169 ~ 172.
Yang Haoyu, Yu Haiye, Zhang Lei, et al. Detecting of chlorophyll content of cucumber leaves based on laser-induced fluorescence spectrum analysis technique [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(10):169 ~ 172. (in Chinese)

6　Tong Xiaojuan, Jun Li, Yu Qiang, et al. Ecosystem water use efficiency in an irrigated cropland in the North China Plain [J]. Journal of Hydrology, 2009, 374(3 ~ 4):329 ~ 337.

7　潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.

8　Zhang Yongjiang, Liu Liangyun, Hou Mingyu, et al. Progress in remote sensing of vegetation chlorophyll fluorescence[J]. Journal of Remote Sensing, 2009, 13(5): 963 ~ 970.

(上接第 139 页)

5　王冠. 桑枝屑含水率快速检测方法及检测设备的研究[D]. 南京:南京林业大学,2007.
Wang Guan. The research on the rapid detection methods and equipments for the moisture content of mulberry sawdust[D]. Nanjing:Nanjing Forest University, 2007. (in Chinese)

6　李长友. 稻谷干燥含水率在线检测装置设计与试验[J]. 农业机械学报,2008,39(3):56 ~ 59.
Li Changyou. Design and experiment of on-line moisture content metering device for paddy drying process[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2008,39(3):56 ~ 59. (in Chinese)

7　于彤. 传感器原理及应用[M]. 北京:机械工业出版社,2008.

8　邓海龙. 传感器与检测技术[M]. 北京:中国纺织出版社,2008.

9　新智工作室. VB6. 0 中文版教程[M]. 北京:电子工业出版社,2001.

10　李勇平. 中文 Visual Basic 6.0 案例教程[M]. 北京:希望电子出版社,2001.

11　杨继萍,郝军启. Access 2003 数据库原理与应用标准教程[M]. 北京:清华大学出版社,2006.