

基于激光诱导叶绿素荧光寿命成像技术的植物荧光特性研究

万文博 华灯鑫 乐静 闫哲 周春艳

Study of plant fluorescence properties based on laser-induced chlorophyll fluorescence lifetime imaging technology

Wan Wen-Bo Hua Deng-Xin Le Jing Yan Zhe Zhou Chun-Yan

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 190702 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.190702

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.190702>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphys.ac.cn/CN/Y2015/V64/I19>

---

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

一种新型的用于差分吸收激光雷达中脉冲式光学参量振荡器的种子激光器的频率稳定方法

[A novel frequency stabilization method for the seed laser of the pulse optical parametric oscillator in differential absorption lidar](#)

物理学报.2015, 64(2): 020702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.020702>

有限远共轭显微镜光镊设计和误差分析

[Design and error analysis for optical tweezers based on finite conjugate microscope](#)

物理学报.2013, 62(10): 100701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.100701>

基于多重散射强度和偏振特征的舰船尾流气泡激光探测方法

[Laser detection method of ship wake bubbles based on multiple scattering intensity and polarization characteristics](#)

物理学报.2013, 62(6): 060704 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.060704>

基于金银合金薄膜的近红外表面等离子体共振传感器研究

[Study of Au-Ag alloy film based infrared surface plasmon resonance sensors](#)

物理学报.2013, 62(6): 060703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.060703>

光镊轴向阱位操控及器件安装误差对径向阱位操控的影响

[Influences of axial position manipulation and misalignments of optical elements on radial trap position manipulation](#)

物理学报.2012, 61(21): 210701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.61.210701>

# 基于激光诱导叶绿素荧光寿命成像技术的植物荧光特性研究\*

万文博 华灯鑫<sup>†</sup> 乐静 闫哲 周春艳

(西安理工大学机械与精密仪器工程学院, 西安 710048)

(2015年4月13日收到; 2015年6月4日收到修改稿)

针对植物荧光遥感探测中信号易受干扰的问题, 提出了一种用于评估植物生长状况及环境监测的荧光寿命成像技术. 采用凹透镜对 355 nm 波长的激光扩束, 再照射植物激发叶绿素荧光, 由增强型电荷耦合器件接收荧光信号. 采用时间分辨测量法, 连续用相同激光脉冲照射植物以激发相同的荧光信号, 同时不断改变激光脉冲触发探测器启动的延时时间, 从而能够得到完整的离散荧光信号分布图像. 对植物特定位置点产生的离散荧光信号进行拟合, 再运用一种改进型的迭代解卷积法可反演高精度的荧光寿命; 进而反演图像各点的荧光寿命以生成植物的荧光寿命分布图. 该方法所绘制的荧光寿命图比荧光强度图能更准确地反映植物内部的叶绿素含量, 并对活体植物叶绿素荧光寿命的物理特性进行了初步研究, 证明叶绿素荧光寿命与植物生理状态存在一定关联; 并且叶绿素荧光寿命与活体植物所处环境存在着复杂的关系. 未来将与生物物理学家们合作, 继续探寻叶绿素荧光寿命与植物生存环境的关系.

**关键词:** 荧光寿命成像, 激光诱导荧光, 荧光雷达, 叶绿素

**PACS:** 07.60.-j, 06.30.Ft, 06.30.Dr, 02.70.Hm

**DOI:** 10.7498/aps.64.190702

## 1 引言

传统的以荧光强度为被测参数的一系列荧光探测技术虽然能够方便的研究植物生理状况, 但荧光本身极其微弱, 又易受环境光、荧光散射角度及激发光强等因素的干扰无法实现远距离遥感探测. 自然界中的环境光包含大量与叶绿素荧光等波长的光子, 在探测任务中这一波长的环境光会随叶绿素荧光一起穿透滤光片, 进入探测仪器的光敏面, 所以探测仪器实际测得的光强并不完全等同于植物发射的荧光光强; 而且植物体任意区域向四面八方发射的荧光光子数也不尽相同, 探测仪器在不同位置接收到的荧光光子数(荧光强度)也肯定不同, 而实际被测区域的叶绿素发射荧光能力是固定的, 所以荧光强度本身也很难真实地反映植物发射荧光的能力; 此外, 荧光强度与激发光强成正比关系,

实际户外环境空气中存在大量微小颗粒物会严重影响激发光的强度分布, 从而干扰受激产生的叶绿素荧光强度. 而荧光寿命反映荧光光子的衰减时间, 不受外界环境光干扰、荧光散射角度、激发光强等因素的干扰, 具有稳定性强的优点; 而且叶绿素荧光寿命成像技术能够实现远距离、大范围植物生理状况空间分布的探测.

激光诱导叶绿素荧光寿命分析技术是一种以植物光合作用理论为基础, 利用植物叶绿素荧光作探针, 研究外界因素对植物生理状况细微影响的新型植物活体测量技术<sup>[1-3]</sup>. 这种技术将逐渐成为环境监测及农业领域的一项热门技术, 激光诱导荧光寿命的探测方法有两种形式: 即荧光寿命扫描技术与激光诱导荧光(laser-induced fluorescence, LIF)寿命成像技术. 前者采用汇聚激光光束对叶绿素进行照射, 激发其产生荧光信号, 然而这种技术无法应用于活体探测, 因为汇聚光束会造成植物

\* 国家自然科学基金(批准号: 61275185)资助的课题.

<sup>†</sup> 通信作者. E-mail: [xauthdx@163.com](mailto:xauthdx@163.com)

组织的损伤<sup>[4,5]</sup>. 而叶绿素荧光寿命成像技术不但能够实现活体植物的无损探测, 而且能够获取植物组织特定区域荧光寿命的分布图. 叶绿素荧光寿命成像 (chlorophyll fluorescence lifetime imaging, CFLIM) 技术利用适当波长的发散激光光源对植物样本进行照射, 使其产生荧光, 并且远距离探测叶片组织不同部位发射荧光的衰减特性, 来获取其生理状况. 此外, 荧光雷达 (fluorescence lidar) 作为一种高分辨率的激光遥感技术已经广泛应用于环境监测, 美国国家航空航天局 (NASA) 已于2011年首次公布了地球植物荧光地图<sup>[6]</sup>.

因为被测叶绿素荧光是从叶绿体内部自发产生的, 比散射或吸收为基础的遥感技术具有更大的区分能力, 所以叶绿素荧光图谱能够高度区分叶绿素分子及其周围环境的其他分子. 此外, 叶绿素荧光寿命不受激发光、环境光强弱及探测器电压大小的影响<sup>[7,8]</sup>. 由于荧光寿命具备这些物理特性, 所以在遥感探测领域, 叶绿素荧光寿命成像技术具有良好的应用前景.

尽管如此, 因为叶绿素荧光很弱、衰减时间极短并且激光光束极易刺激或损伤到植物组织, 所以远距离拍摄叶绿素荧光寿命图谱是个具有挑战性的任务, 传统的仪器和方法很难实现. 国外已初步开展了获取此类荧光寿命图谱的工作, 但国内这方面的研究还很少<sup>[9-11]</sup>. 近几年来, 单光子计数技术在时间响应和计数速率方面都有了较大的提升, 使发射激光脉冲与远距离采集叶绿素荧光信号同步进行成为可能. 这里, 尝试利用时间分辨荧光测量法<sup>[12-14]</sup>, 使激光脉冲按一定“门控延时”触发增强型电荷耦合器件 (intensification charge-coupled device, ICCD) 以预设“曝光时间”采集活体植物的叶绿素荧光光子信号, 从而获取包含大量时间通道的像素点阵列数据——CFLIM数据. 再采用图像处理技术对所有CFLIM数据进行逐点处理, 最终能够获得整个拍摄区域的荧光寿命分布. 这项技术将被应用于激光诱导荧光寿命雷达 (LIFL-lidar) 来实现大范围陆生植物生长状况的监测.

## 2 激光诱导叶绿素荧光寿命成像技术的基本原理

### 2.1 激光诱导叶绿素荧光寿命的测量原理

激光诱导荧光寿命成像技术通常先对激光进行扩束, 再照射植物, 激发叶绿素荧光, 由ICCD记录荧光信号. ICCD任意像素点接收到的荧光

信号  $m_{ij}(t)$  实际为激光诱导叶绿素荧光信号  $y_{ij}(t)$  与ICCD响应函数  $\text{irf}(t)$  的卷积 (这里  $i, j$  分别表示ICCD拍摄的图像中像素点的横纵坐标); 而  $y_{ij}(t)$  为激光脉冲函数  $p(t)$  与荧光衰减函数  $g_{ij}(t)$  的卷积. 这里

$$g_{ij}(t) = A \cdot \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

$\tau$  为荧光寿命值. 因此, ICCD任意像素点采集到的荧光信号可表示为

$$\begin{aligned} m_{ij}(t) &= \text{irf}(t) \otimes y_{ij}(t) = [\text{irf}(t) \otimes p(t)] \otimes g_{ij}(t) \\ &= \text{srf}(t) \otimes g_{ij}(t). \end{aligned} \quad (2)$$

由(2)式可见, 要提取荧光寿命值就必先获取荧光衰减函数  $g_{ij}(t)$ . 用不产生荧光的石英玻璃反射激光脉冲, 由ICCD记录的反射激光脉冲信号可表示系统响应函数  $\text{srf}(t)$ <sup>[15]</sup>. 以后每次将ICCD测到的荧光信号  $m_{ij}(t)$  对  $\text{srf}(t)$  解卷积就能得到被测荧光的衰减函数  $g_{ij}(t)$ , 再根据(1)式反演荧光寿命  $\tau$ . 此外, 叶绿素荧光寿命具有以下特性:

$$\tau = 1/(k_r + k_{nr}). \quad (3)$$

其中,  $k_r$  表示荧光发射速率,  $k_{nr}$  为非辐射 (光合作用) 过程的速率<sup>[16]</sup>.

### 2.2 叶绿素荧光寿命成像技术

使用ICCD拍摄的一组连续变化的叶绿素荧光强度图称CFLIM数据. CFLIM数据中每一张数据图都是许多荧光信号的一个剖面, CFLIM数据也可被看作含大量时间通道的像素点阵列, 如图1左所示. 每个像素点都是能记录一组离散荧光数据的时间通道, 拟合离散荧光数据, 可得到平滑的荧光信号曲线如图1右所示. 对植物特定区域变化的荧光进行连续拍摄就能得到该区域离散荧光信号的分布, 再拟合所有像素点的数据. 并依次用拟合过的荧光数据对系统函数做解卷积处理, 就能得到各像素点的荧光衰减函数, 从而反演它们的荧光寿命, 绘制植物荧光寿命图谱.

由于荧光衰减时间极短, 而荧光图像数据量又大, 存储时间长, 故ICCD一次只能拍摄到荧光信号中的一幅剖面图. 因此, 采用时间分辨测量法, 连续用相同激光脉冲照射植物以激发相同的荧光信号, 并使激光脉冲触发ICCD拍摄, 这期间须不断改变ICCD的“启动延时”, 即可获取不同时段荧光信号的剖面图, 从而得到完整的离散荧光数据. 这里ICCD预设“曝光时间”应小于被测物的荧光寿命.

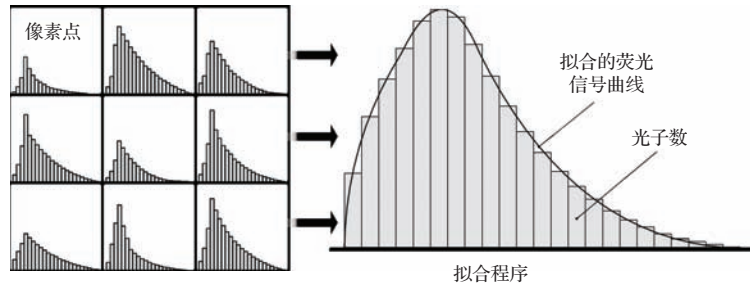


图1 CFLIM 原始数据中各像素点荧光信号的拟合

Fig. 1. The fluorescence signals fitting for individual pixels in CFLIM initial data.

### 3 激光诱导叶绿素荧光寿命成像系统的设计

激光诱导叶绿素荧光寿命成像系统如图2所示, 采用的10 Hz的Nd:YAG激光器(脉冲宽度  $\leq 7$  ns、光斑直径  $\leq 7.5$  mm、输出波长355 nm、脉冲能量50 mJ)作光源. 出射光束经355 nm高反分光镜分离激光杂光(1064 nm基频光和532 nm二倍频激光)后, 经3次反射再用焦距45 mm的凹透镜对其扩束, 均匀的照射(激光入射密度为  $\sim 0.25$  mJ/cm<sup>2</sup>)在植物叶片上; 同时在分光镜后放置吸收盒吸收激光杂光, 这种吸收盒利用陶瓷片吸收激光杂光时, 会向周围散射出微弱的激光信号, 因此在吸收盒旁放置一个光电二极管(photoelectric diode, PD)接收这些激光信号, 以触发ICCD(ICCD镜头前可装中心波长680 nm或740 nm、带宽10 nm的窄带滤光片)采集荧光信号. 待荧光信号采集完毕, 将被测植物叶片取下, 在原来固定叶片的位置放置一块石英玻璃, 并将滤光片更换为355 nm的衰减片, 就可用ICCD测得系统响应函数  $srf(t)$ . 将ICCD采集到的CFLIM数据存储并传输到计算机进行图像数据处理, 就能绘制植物荧光寿命图谱.

时间分辨测量法需要严格的时间控制, 实现激光器与接收器的同步工作是荧光寿命成像过程中的关键一步. 从PD接收触发信号到触发ICCD启动拍摄会有  $\sim 50$  ns的延时; 而激光诱导荧光信号的持续时间在20 ns以内. 所以如果激光直接照射植物, ICCD将无法抓拍到受激产生的荧光. 因此要使激光传播一定距离后产生一段“激发延时”, 再照被测植物以补偿ICCD的触发延时. 这里  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ 的总距离取15.20 m恰等于在ICCD的触发延时间光在空气中传播的路程. 这里采用美国

Princeton Instruments公司的PIMAX 3型ICCD, 预设“曝光时间”为0.02 ns. 使用ICCD控制软件设定连续拍摄时, 每次ICCD的“启动延时”时间比前一次增加0.02 ns, 总共拍摄1000次, 这样就能得到完整的离散荧光信号.

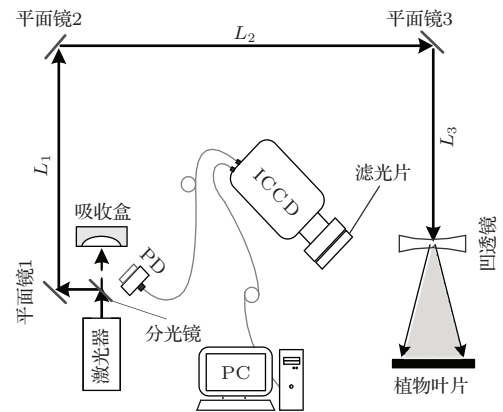


图2 激光诱导叶绿素荧光寿命成像系统原理图

Fig. 2. Schematic of laser-induced chlorophyll fluorescence lifetime imaging system.

## 4 实验结果与分析

### 4.1 植物叶绿素荧光光谱分析

叶绿素荧光光谱反映叶绿素分子基态与各激发态间的能量差. 图3为生理状况良好的绿萝叶片的叶绿素荧光光谱图. 如图所示, 荧光光谱分别在  $\sim 680$  nm与  $\sim 740$  nm处存在两个波峰, 它们分别是光系统II和光系统I中的叶绿素分子产生的, 且光系统I的激发能源于光系统II. 光系统I中的叶绿素分子主要分布于类囊体膜的非垛叠部分; 而光系统II中的叶绿素分子主要分布于类囊体膜的垛叠部分, 且与类囊体膜上特定蛋白质结合具有更稳定的结构. 随植物生理状况的变化, 其叶绿体内部物理结构发生变化, 两个光系统的工作效率也相应改变, 从而影响两波峰处的荧光信号.

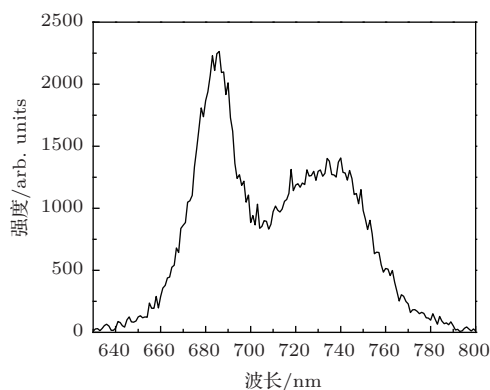


图3 植物的激光诱导叶绿素荧光光谱图  
Fig. 3. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectrum from plant.

### 4.2 叶绿素荧光寿命图谱的测量结果分析

选取暗适应1 h生理状态良好的绿萝叶片, 固定在如图2所示系统中被测物的位置, 用发散激光对其照射. 图4(a)为一组典型的CFLIM数据(740 nm波长的荧光)中的一幅荧光光强分布图. 对这组CFLIM数据中的各像素点的荧光信号  $m_{ij}(t)$  进行数据拟合后 ( $0 < i < 220, 0 < j < 245$ ),

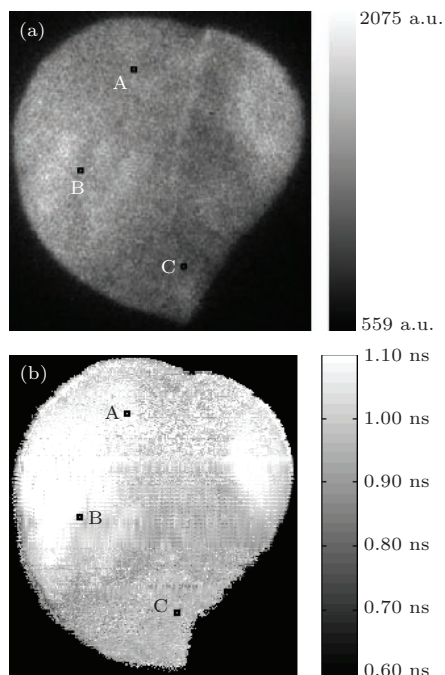


图4 被测植物叶片的叶绿素荧光强度及寿命分布图 (a) 植物叶片叶绿素的荧光强度分布; (b) 植物叶片叶绿素的荧光寿命分布图谱

Fig. 4. Chlorophyll fluorescence intensity and lifetime distribution of the measured plant leaf: (a) chlorophyll fluorescence intensity distribution of the plant leaf; (b) chlorophyll fluorescence lifetime distribution of the plant leaf.

再使所有荧光信号逐个对系统响应  $srf(t)$  进行解卷积就能得到被测叶片的荧光寿命分布图, 如图4(b)所示.

在CFLIM数据中任意取3个像素点A, B, C为例来展示叶绿素荧光寿命的反演过程, 这里像素点A, B, C的坐标分别为(90, 45), (53, 124)与(128, 197), 如图4所示. 首先计算ICCD的平均暗电流强度, 如图4(a)被测叶片周围黑色吸光纸区域的平均光强可近似等于ICCD的平均暗电流强度, 对CFLIM数据减去平均暗电流强度后, 可基本消除暗电流对荧光信号的影响. 由于荧光寿命是时间参量所以剩余较小的暗电流强度误差完全不会影响反演结果 [17,18]. 像素点A, B, C的荧光数据减去平均暗电流的强度后, 如图5所示.

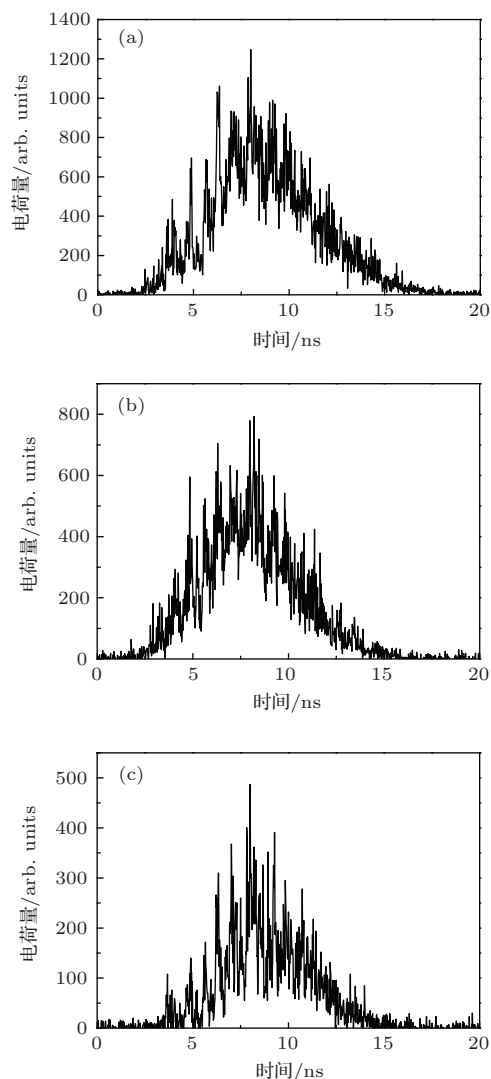


图5 ICCD同时记录3个通道的荧光信号 (a) 像素点A的荧光信号; (b) 像素点B的荧光信号; (c) 像素点C的荧光信号

Fig. 5. Fluorescence signal recorded simultaneously in three channels: (a) fluorescence signal of pixel A; (b) fluorescence signal of pixel B; (c) fluorescence signal of pixel C.

对像素点 A, B, C 的数据进行拟合得到荧光信号  $m_A(t)$ ,  $m_B(t)$  及  $m_C(t)$  的曲线如图 6 所示. 再采用一种改进型迭代解卷积法使  $m_A(t)$ ,  $m_B(t)$  及  $m_C(t)$  分别对  $srf(t)$  进行解卷积, 能够有效抑制解卷积过程中的不断被放大的迭代误差 [19,20], 从而得到像素点 A, B, C 的荧光衰减函数  $g_A(t)$ ,  $g_B(t)$  及  $g_C(t)$ , 它们的函数曲线如图 7 所示, 函数表达式如 (1) 式所示, 根据 (1) 式即可反演出相应的荧光寿命值  $\tau_A$ ,  $\tau_B$ ,  $\tau_C$ , 分别为  $1.02 \text{ ns} \pm 0.04 \text{ ns}$ ,  $0.95 \text{ ns} \pm 0.05 \text{ ns}$  和  $0.89 \text{ ns} \pm 0.04 \text{ ns}$ .

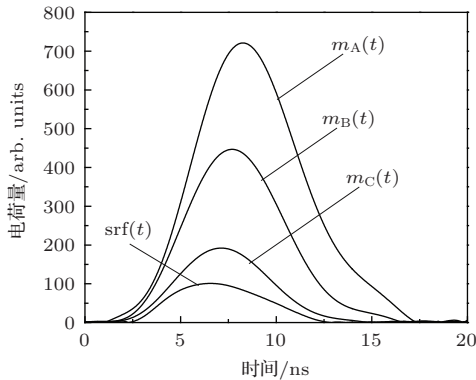


图 6 植物叶绿素荧光信号及系统响应函数曲线  
Fig. 6. Plant chlorophyll signals and system response function curves.

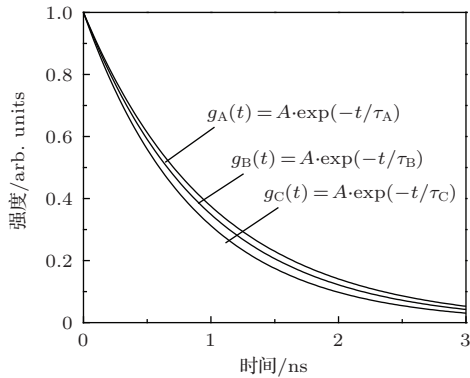


图 7 植物叶绿素的荧光衰减曲线  
Fig. 7. Plant chlorophyll fluorescence decay curves.

### 4.3 植物叶绿素荧光寿命的物理特性分析

选取一批生理状况良好的绿萝植株, 在室内气温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度  $54\%$  的环境下, 每天上午 9 时对这批植株在水胁迫条件下进行连续 16 天 (d) 的荧光寿命监测实验, 分别获取它们 680, 740 nm 的荧光寿命分布, 再求得各分布图的荧光寿命平均值. 它们的平均荧光寿命变化趋势如图 8 所示. 两个波长的平均荧光寿命在一周后开始增大 (此时肉眼可观察到被测叶片开始出现枯黄迹象), 当达到最大

值后 680 nm 荧光寿命开始下降, 但下降到一定程度就趋于平稳 (此时肉眼可观察到相应叶片已完全枯黄), 而 740 nm 的荧光寿命则不断下降.

研究表明, 在植物水分亏缺初期叶绿素光合作用效率  $k_{nr}$  和荧光发射效率  $k_r$  开始下降,  $k_r$  的降低导致叶绿素荧光强度减弱. 根据 (3) 式可知此时  $k_{nr}$  与  $k_r$  的降低将导致荧光寿命增大. 当水分亏缺到一定程度, 部分叶绿素分解 (此时能够用肉眼观测到植物的枯萎迹象) 以至于不能正常发射荧光光子, 荧光强度和寿命都开始降低. 光系统 II 中的叶绿素分子结构较稳定, 缺水条件下不易分解, 因此 680 nm 荧光寿命降低到一定程度就会趋于固定; 而光系统 I 中的叶绿素分子在缺水条件下大量分解, 所以 740 nm 荧光寿命会持续减弱 [21-23]. 根据叶绿素荧光寿命的这一物理特性, 可通过探测 740 nm 荧光寿命来判定植物生理状况, 若发现某一区域 740 nm 植物荧光寿命有增大趋势, 说明该区域植物已有病变迹象, 就能提前制定预防措施.

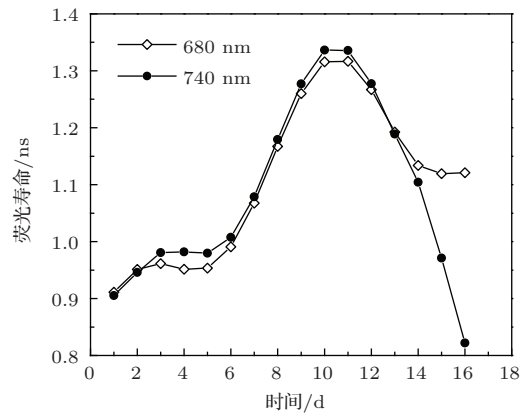


图 8 680 nm 与 740 nm 波长植物叶绿素荧光寿命的变化趋势  
Fig. 8. The variation trend of plant chlorophyll fluorescence lifetime at the wavelengths of 680 nm and 740 nm.

### 4.4 植物叶绿素含量与荧光寿命的标定曲线

由于 740 nm 处的荧光寿命受植物生理状况影响较大, 故选用 740 nm 处的荧光来表示荧光寿命与叶绿素含量的关系. 挑选大量颜色不同的绿萝叶片, 裁成直径 2.2 cm 的圆形的叶片. 测试完这批叶片的荧光寿命后, 分别将各叶片放入 4 ml 乙醇 (95%) 与丙酮 (80%) 以体积比 1 : 2 配制的混合溶液内, 萃取叶片中的叶绿素, 再用分光光度计测得各溶液的叶绿素含量, 即可得到叶片单位面积叶绿素含量与荧光寿命的关系如图 9 所示.

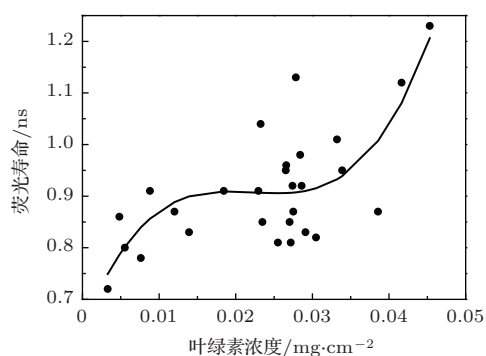


图9 植物叶绿素含量与荧光寿命的定标曲线

Fig. 9. The calibration curve of plant chlorophyll concentration and fluorescence lifetime.

由图9可见, 叶绿素含量与荧光寿命成线性关系. 当叶片叶绿素浓度处于较高或较低水平时, 荧光寿命随叶绿素浓度的增加有增强的趋势. 而叶绿素浓度处于一般水平时, 荧光寿命波动较大, 其原因在于这类样品中生理状况正常的叶片荧光寿命会处于一个比较稳定的水平; 包含较多受到轻度胁迫细胞的叶片荧光寿命偏大; 而包含较多受到重度胁迫细胞的叶片荧光寿命又偏低. 若采用该方法展开更多类似工作, 就能实现大范围植物叶绿素含量的实时监测.

## 5 结 论

通过设计激光诱导叶绿素荧光寿命成像系统, 运用时间分辨测量法成功绘制了绿萝叶片的叶绿素荧光寿命图谱. 在此基础上, 尝试性的对绿萝植株的叶绿素荧光寿命进行了连续监测, 展示了这种植物在水分胁迫状态下, 其叶绿素荧光寿命的变化特性; 并通过对大量不同叶绿素含量的绿萝叶片进行了测试, 初步得到了绿萝叶片的叶绿素含量与荧光寿命的对应关系. 实验结果表明: 该方法不但能够有效的绘制荧光寿命图谱, 而且具有大视场、非接触的测量优点, 可实现植物表面荧光寿命分布的无损探测; 而且这项技术具有预测植物生长变化的前景, 在植物环境监测领域具有很大应用潜力, 荧光寿命也将成为反映植物生理状况的一项新指标. 未来将与生物物理学家合作, 运用该方法研究大量不同种类植物叶绿素荧光寿命与环境的关系.

## 参考文献

- [1] Janusauskaite D, Feiziene D 2002 *Acta. Agr. Scand. B-S. P.* **62** 7
- [2] Tol C, Verhoef W, Rosema A 2009 *Agr. Forest Meteorol.* **149** 96
- [3] Men Z W, Fang W H, Li Z W, Qu G N, Gao S Q, Lu G H, Yang J G, Sun C L 2010 *Chin. Phys. B* **19** 8
- [4] Fu C Y, Ng B K, Razul S G 2009 *J. Biomed Opt.* **14** 064009
- [5] Zhao M, Peng L L 2010 *Opt. Lett.* **35** 2910
- [6] Jordi R, Michael S, Santiago R 2012 *Opt. Lett.* **37** 1229
- [7] Hungerford G, Birch D J S 1996 *Meas. Sci. Technol.* **7** 121
- [8] Yuan S, Chin S L, Zeng H P 2015 *Chin. Phys. B* **24** 1
- [9] Roberts M S, Dancik Y, Prow T W, Thorling C A, Lin L L, Grice J E, Robertson T A, Konig K, Becker W 2011 *Eur. J. Pharm Biopharm* **77** 469
- [10] Gutierrez-Navarro O, Campos-Delgado D U, Arce-Santana E R, Maitland K C, Cheng S, Jabbour J, Malik B, Cuenca R, Jo J A 2014 *Optics Express* **22** 12255
- [11] Miao Z, Li S F, Zhang Q Y 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 4321 (in Chinese) [苗壮, 李善锋, 张庆瑜 2006 物理学报 **55** 4321]
- [12] Alex S, Mary L 2014 *Opt Lett* **39** 5362
- [13] Oliveira F F, Ito A S, Bachmann L 2010 *Appl. Optics* **49** 2244
- [14] Wei H Y, Xu T, Wang F, Peng X S, Wei X, Liu S Y 2013 *Acta Optica Sinica* **33** 0823001 (in Chinese) [魏惠月, 徐涛, 王峰, 彭晓世, 韦欣, 刘慎业 2013 光学学报 **33** 0823001]
- [15] García M, Vázquez R, Isakina S, López R 2012 *Electrical Communications and Computers* **27** 317
- [16] Kennifer R D, Peter M A T 2003 *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology* (Holland: Kluwer Academic Publishers) pp109-132
- [17] Kotzagianni M, Couris S 2013 *Chemical Physics Letters* **561** 36
- [18] Xu M F, Shi Y B, Gao W H, Chen H Y 2014 *Chinese Journal of Lasers* **41** 0108005 (in Chinese) [徐美芳, 石云波, 高文宏, 陈海洋 2014 中国激光 **41** 0108005]
- [19] Mukamel E A, Babcock H, Zhuang X W 2012 *Biophysical Journal* **102** 2391
- [20] Wan W B, Hua D X, Le J, Liu M X, Cao N 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 190601 (in Chinese) [万文博, 华灯鑫, 乐静, 刘美霞, 曹宁 2013 物理学报 **62** 190601]
- [21] Lichtenthaler H K 2011 *Applications of chlorophyll fluorescence* (Holland: Kluwer Academic Publishers) pp182-196
- [22] Kumar P J, Gopal R 2011 *Spectroscopy-Biomedical Applications* **26** 129
- [23] Fang W H, Li Z W, Li Z L, Qu G N, Ouyang S L, Men Z W 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 153301 (in Chinese) [房文汇, 里佐威, 李占龙, 曲冠男, 欧阳顺利, 门志伟 2012 物理学报 **61** 153301]

# Study of plant fluorescence properties based on laser-induced chlorophyll fluorescence lifetime imaging technology\*

Wan Wen-Bo Hua Deng-Xin<sup>†</sup> Le Jing Yan Zhe Zhou Chun-Yan

(School of Mechanical and Precision Instrument Engineering, Xi'an University of Technology, Xi'an 710048, China)

( Received 13 April 2015; revised manuscript received 4 June 2015 )

## Abstract

Plant fluorescence is a susceptible signal in plant fluorescence remote sensing detection. In order to solve this problem, a technique for plant chlorophyll fluorescence lifetime imaging is presented to evaluate living status for plant growth and environmental monitoring. A concave lens is used to expand laser beam at a wavelength of 355 nm, and the living plant is exposed in this laser light source to excite chlorophyll fluorescence. And the chlorophyll fluorescence signals are detected by an intensification charge coupled device. Time resolved measurement method is used in this article, so that every time the same fluorescence signals can be excited by the same laser pulse. Meanwhile, the delay time needed for triggering intensification charge coupled device should be changed consecutively, and the whole discrete fluorescence signal can be obtained. The discrete fluorescence signals from the particular location points of the plant are fitted. An improved method of forward iterative deconvolution is used to retrieve the corresponding fluorescence lifetime, and the high-precision fluorescence lifetime can be obtained. Furthermore, the fluorescence lifetime values at all the location points are retrieved to obtain the distribution map of chlorophyll fluorescence lifetime. This method can give the chlorophyll fluorescence image efficiently. The distribution map of fluorescence lifetime can more effectively reflect the plant chlorophyll concentration than the fluorescence intensity image does. The physical property of chlorophyll fluorescence lifetime from living plants has been studied preliminarily, indicating that the plant physiological status is related to its fluorescence lifetime to a certain extent; and the chlorophyll fluorescence lifetime and plant environment have a subtle and complex correlation. In the future, the relationship between chlorophyll fluorescence lifetime and plant environment will be expected to study with the cooperation of biophysicist.

**Keywords:** fluorescence lifetime imaging, laser-induced fluorescence, fluorescence lidar, chlorophyll

**PACS:** 07.60.-j, 06.30.Ft, 06.30.Dr, 02.70.Hm

**DOI:** 10.7498/aps.64.190702

---

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 61275185).

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail: [xauthdx@163.com](mailto:xauthdx@163.com)