

FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER APLICADA À IDENTIFICAÇÃO REMOTA DE ESPÉCIES E ESTRESSE NA VEGETAÇÃO

Nunes, R. A.¹; Carvalho, I. M.¹; Cremona M.¹; Bunkin, A. F.¹; da Silva, F.C.²
 (1) Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rua Marquês de São Vicente, 225, Caixa Postal 38008, CEP 22453-900, Rio de Janeiro, RJ, nunes@dcm.puc-rio.br; (2) EMBRAPA/CNP Solos, Rua Jardim Botânico, 1024, CEP-22.460-000, Rio de Janeiro, RJ, fabio@cnps.embrapa.br

ABSTRACT

In this paper a technical description of a Laser Induced Fluorescence equipment available at the PUC-Rio is presented. Its application in measuring "in situ" the stress state of vegetation makes it a useful tool in many environmental remote sensing conditions. Preliminary results in vegetation identification and cold stress state are also presented.

RESUMO

Neste trabalho apresentamos uma descrição técnica do equipamento de fluorescência induzida por laser existente na PUC-Rio, dentro de um enfoque de sensoriamento ambiental remoto. São apresentados também os primeiros resultados obtidos com esta técnica para a identificação de espécies e estresse por frio em amostras da vegetação característica da mata atlântica e de hortaliças.

1 Introdução

O grupo de Instrumentação e Materiais do DCMM-PUC-Rio (GIM-PUC), a partir de uma cooperação com a Academia de Ciências da Rússia, está implementando no seu laboratório de luminescência, um sistema de fluorescência induzida por laser (LIF - LIDAR - Laser Induced Fluorescence - Light Detection And Ranging) capaz de determinar remotamente mudanças no estado de estresse da vegetação ou na qualidade da água contida em reservatórios. Este equipamento com algumas adaptações pode ser também utilizado para obter informações sobre a composição química da superfície do solo ou água através da técnica de espectroscopia por plasma induzido por laser.

No início da década de 90, inúmeros trabalhos (Lichterthaler et al, 1992 e Barbini et al, 1993) evidenciaram que a fluorescência da clorofila na região do azul ao vermelho se constituía numa característica própria de cada planta e do seu estado de estresse. A técnica de fluorescência induzida por laser, devido a sua característica não-invasiva e não-destrutiva, aliando simplicidade e rapidez na obtenção do resultado e a possibilidade de realização de medidas "in situ" tem atraído o interesse no desenvolvimento de equipamentos com características adequadas a sua utilização no sensoriamento ambiental remoto.

A fotossíntese é um processo baseado na absorção e conversão da energia solar em energia química. Esta absorção desencadeia a ativação de um grande número de reações químicas e enzimáticas complexas que terão

por resultado final a produção de carboidratos a partir da água e do dióxido de carbono. Uma parcela de energia solar absorvida que não é transformada em energia química é reemitida sobre a forma de luz causando o efeito denominado de fluorescência. Desta forma quanto mais saudável é a planta menos fluorescência ela exibe devido a maior eficiência na conversão energética. Portanto a eficiência quântica da fluorescência da vegetação é um parâmetro extremamente sensível a variações da eficiência fotoquímica.

Por exemplo, a razão entre as intensidades de fluorescência da clorofila nos comprimentos de onda de 690 e 740nm [F(690)/F(745)] varia fortemente com a variação das condições hídricas e de fertilidade do solo que irão influenciar na eficiência da fotossíntese.

A razão [F(450)/F(540)] também é um indicador do estresse, fornecendo um indicador da variação da quantidade de substâncias que agem naturalmente como filtro para o excesso de irradiação UV, o que pode ser de grande valia para estudos fitogeográficos florestais. A razão [F(450)/F(540)] pode ser utilizada para identificar a quantidade de outros pigmentos tais como a clorofila b e a xantofila (Gunther et al, 1994). A análise dos dados da fluorescência da clorofila no domínio temporal fornece informações sobre as condições fisiológicas da vegetação (Gunther et al, 1993). A cinética da fluorescência é um indicador das condições da vegetação e está relacionada com o transporte eletrônico, produção de O₂ ou fixação de CO₂ (Krause et al, 1991), o que em última análise reflete o potencial de produção do sítio florestal.

2 Objetivos

As técnicas de monitoração com laser muitas vezes se equiparam, em resolução, com as mais poderosas técnicas de análise laboratorial e podem superar em muito no que diz respeito ao trabalho, custo e tempo necessário à obtenção de uma massa de resultados adequada a caracterização de uma região.

Este trabalho tem como objetivo realizar testes iniciais de utilização da técnica Laser para quantificar a fluorescência da clorofila em amostras de plantas crescidas sob diferentes condições nutricionais. Visa também

correlacionar os dados que serão obtidos no domínio espectral com a atividade fotossintética das plantas cultivadas em condições naturais no campo, bem como naquelas cultivadas em condições controladas no laboratório.

3 Materiais e Métodos

3.1 Descrição funcional do LIDAR

A figura 1 apresenta um diagrama do LIDAR.

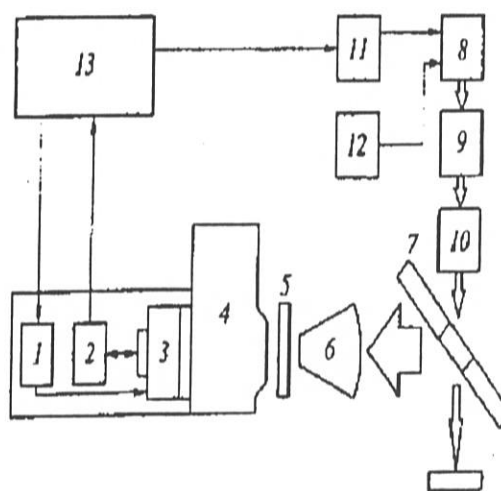


Figura 1. Diagrama do Lidar: (1) Oscilador dos pulsos de "strobe", (2) sistema de controle do CCD, (3) intensificador de luz, (4) policromador, (5) filtro, (6) telescópio, (7) Espelho rotativo, (8) laser, (9) dobrador de frequência, (10) gerador de 3º harmônico, (11) fonte de alimentação, (12) sistema de refrigeração, (13) sistema de controle do lidar.

A fonte de excitação utilizada é um laser de Nd:YAG com as seguintes características:

- duração do pulso de "probe" 8 ns,
- taxa de repetição do pulso 10 Hz,
- energia do pulso:
 - 1º harmônico ($\lambda=1064$ nm) 600 mJ
 - 2º harmônico ($\lambda= 532$ nm) 280 mJ
 - 3º harmônico ($\lambda= 354$ nm) 100 mJ.
- divergência do feixe 0,5 mrad
- modo de operação: "active Q-switched"
- consumo aproximado 1kW
- Peso 20kg
- Sistema de refrigeração fechado.

O sistema LIDAR, em operação, funciona como descrito a seguir. A radiação emitida pelo transmissor (8) é direcionada através de um sistema de espelhos (7) ao ponto remoto (distância típica de 10 a 200 m) onde se deseja

realizar a medida. A radiação retrodifusa elásticamente (eco - com o comprimento de onda da excitação do laser) e o sinal de fluorescência (no comprimento de onda do pigmento presente na vegetação), eventualmente filtradas ópticamente(5), são recolhidas por um telescópio Newtoniano(6) que as focaliza na janela do policromador(4).

O projeto do policromador, montado num esquema de autocolimação com rede de difração, permite seu uso com as primeiras 10 ordens de difração. A rede de difração possui 300 linhas/mm. A fenda de entrada do policromador pode variar de 50 a 200 μm variando a resolução da rede de difração. No caso ela foi fixada de tal modo a termos uma dispersão de primeira ordem de 40nm/mm, e uma dispersão de segunda ordem de 20nm/mm, portanto com o dobro de resolução espectral.

Para detecção foi utilizado um amplificador opto-eletrônico, intensificador de luz, (3) com ganho de 10^4 que em seguida fornece o sinal amplificado a um CCD ("charge coupled device") linear (2) de 1024 elementos e 12.5 mm de comprimento. A faixa de operação espectral (em 1ª ordem) vai de 400 a 900 nm.

O sub-sistema câmera-intensificador de luz pode operar em modo contínuo ou pulsado de acordo com o tipo de laser utilizado e em função das condições de iluminação externa. É possível se variar o tempo de "gating" do intensificador de luz variando-se a largura dos pulsos de 0.5 a 100 μs para ajustar a medida ao nível de radiação de "background", i.e., pulsos curtos para alto nível de "background" e pulsos longos para baixos níveis.

A leitura dos níveis de sinal do CCD é feita através de conversão analógico-digital, com 14 bits por amostra e resolução equivalente a 10 fótons por bit.

O sistema de controle do LIDAR(13) consiste num microcomputador IBM-PC compatível operando com um software especificamente desenvolvido para processamento dos sinais obtidos pelo espectrômetro laser. Este sistema, que opera em ambiente Windows, comanda ainda o módulo eletrônico de controle do CCD(2).

3.2 Procedimento Experimental

No caso específico do uso de LIF-Lidar no mapeamento do estado de estresse da vegetação podem ser utilizados dois comprimentos de onda para a excitação da fluorescência que são o 532nm (2º harmônico) e 355nm (3º harmônico).

As experiências em laboratório foram feitas sobre mudas de espécies representativas da mata-atlântica adquiridas no Horto Florestal do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (mogno, pau brasil e gonçalo alves) e de hortaliças, adquiridas, no mercado regional, como se fossem para consumo (espinafre, beralha, salsa, aipo, brócolis e couve-flor). As folhas foram colocadas a uma distância de 2m do LIDAR. A área de iluminação da amostra (diâmetro do feixe do laser incidente sobre a planta) foi 3cm². A excitação foi realizada utilizando-se os comprimentos de onda do 2º e 3º harmônicos (532 e 355nm). Os resultados foram tomados fazendo-se a média ao longo de 10 a 30 pulsos do laser com taxa de repetição de 1Hz. Isto significa que o tempo despendido para a obtenção de cada espectro foi de 30 segundos. O tempo de acumulação de carga no CCD foi de 2 μs por pulso, isto é, a largura do pulso de "gating" do intensificador de luz foi de 2 μs .

Em algumas mudas foram realizadas medidas sobre folhas jovens e adultas de forma a avaliar a diferença no nível da atividade fotossintética. Com o objetivo de ilustrar o efeito do estresse provocado por frio, simulou-se o efeito de um vento frio, soprando-se um vapor de nitrogênio líquido sobre um tipo de bromélia existente no campus da PUC.

4 Resultados e Discussões

Nas figuras 2 e 3 são apresentados a resposta fluorescente de diferentes amostras vegetais excitados com o 3º harmônico. Nestes espectros podem ser observados emissões nas regiões do azul (450nm), verde (540nm) e vermelho (R1 em 690nm e R2 em 740nm). A intensidade absoluta da emissão em torno destas regiões, ou melhor a intensidade normalizada, pode ser utilizada na montagem de diagramas bivariável do tipo mostrados nas figuras 5 e 6,

normalmente utilizados no reconhecimento de padrões.

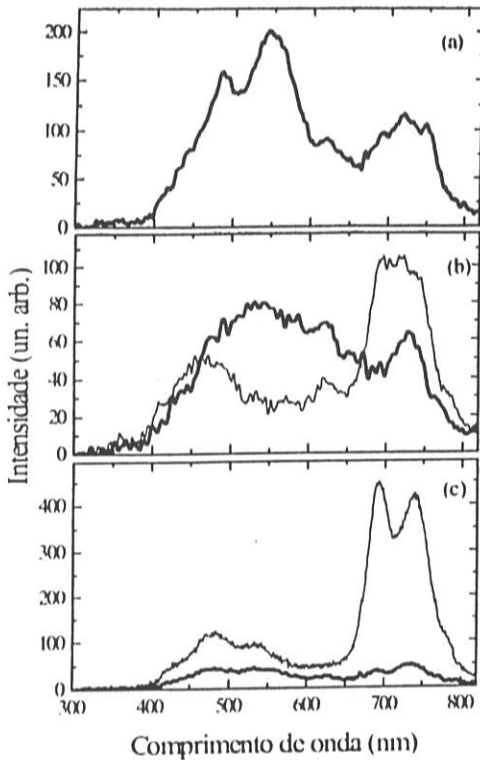


Figura 2. Espectros de fluorescência de diferentes amostras vegetais excitadas a $\lambda = 354$ nm. (a) pau brasil; (b) gonçalo alves ; (c) mogno. Em linha mais grossa são indicadas as fluorescências das folhas adultas.

A figura 2b, apresenta medidas sobre folhas de uma mesma muda porém fazendo-se incidir o pulso de laser sobre folhas adultas e novas (sendo que as folhas novas apresentam uma coloração avermelhada).

O que podemos destacar aqui é a menor intensidade da fluorescência na região do vermelho (R1 e R2) para as folhas adultas quando comparadas com as emissões das folhas novas. Esta diferenciação está relacionada com os diferentes níveis de concentração de pigmentos e de clorofila-a nas folhas novas e adultas.

Na figura 3 está exemplificado a consequência do estresse produzido por frio sobre uma planta da família das bromélias. Após a ocorrência do estresse a emissão na região do vermelho (R1 e R2) aumenta por um fator 2,0 para R1 e 1,5 para R2. A emissão nesta região é característica da clorofila-a cujo aumento de emissão

significa uma diminuição na eficiência do processo de fotossíntese.

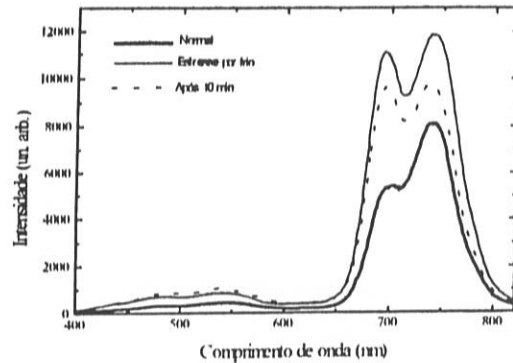


Figura 3. Exemplo de estresse por frio produzido sobre uma planta da família das bromélias.

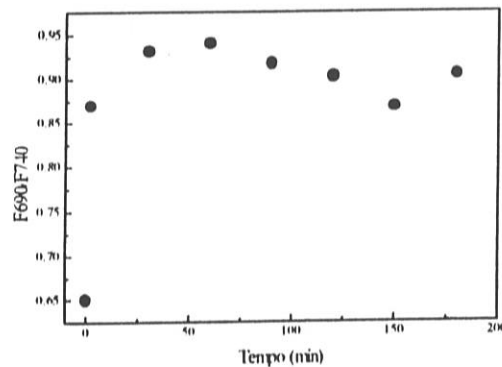


Figura 4. Evolução temporal da razão F690/F740 de uma planta da família das bromélias, após o estresse por frio provocado em $t=0$.

A alta intensidade de fluorescência para esta amostra excitada no ultravioleta, quando comparada com as mudas de pau-brasil, mogno e gonçalo alves se deve a dois fatores: primeiro ao fato de a bromélia estar sendo cultivada no interior de uma sala onde naturalmente o nível de radiação UV é pequeno não exigindo que a planta desenvolva filtros para a proteção da radiação UV. Segundo devido ao fato de uma maior espessura acarreta um maior volume excitado. A figura 4 evidencia os efeitos produzidos pelo frio através do aumento da razão F690/F740 para valores superiores a 0,85.

O diagrama da figura 5 mostra a razão normalizada da emissão em 540nm (F540) pela emissão em 690 e 730 nm (F690 e F730). Um diagrama deste tipo é útil para identificação de espécies de vegetação (fig. 6) ou para a caracterização do estado de estresse de uma determinada vegetação.

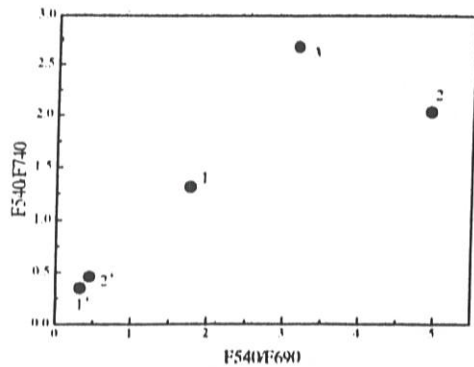


Figura 5. Diagrama da distribuição das razões entre as integrais das bandas F540/F740 e F540/F690 para diferentes tipos de plantas excitadas a $\lambda=354$ nm. 1=mogno; 1'=mogno broto; 2=g.alves; 2'=g.alves broto; 3=pau brasil.

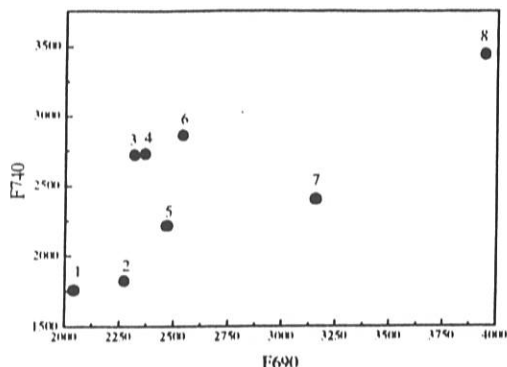


Figura 6. Diagrama da distribuição das integrais das bandas F740 e F690 para diferentes vegetais excitados a $\lambda=354$ nm. 1=couve flor; 2=berlha; 3=espinafre; 4=aipo; 5=brocolis; 6=salsa; 7=alface; 8=agrião.

5 Conclusões

O equipamento, ora em fase de teste, se apresenta como ferramenta útil no estudo da vegetação. Seu peso relativamente baixo e sua montagem compacta permite que o mesmo possa ser facilmente transportado para o campo com vista a realização de medidas de sensoriamento remoto. A potência do laser e a sensibilidade do seu sistema de detecção permite inclusive que o mesmo seja instalado numa pequena aeronave, (até num ultraleve), para medidas de altitude de 100 a 200m.

Os resultados aqui apresentados foram obtidos por ocasião de testes e calibração do equipamento. Estes resultados preliminares não reproduzem situações de campo por vários motivos. Por exemplo, no caso das hortaliças, as mesmas já haviam sido colhidas a pelo menos dois dias na ocasião das medidas.

Apesar disto os diagramas correspondentes as figuras 5 e 6 indicam que este tipo de dado quando associado à posição geográfica, obtida através de um GPS (Geographical Positioning System), poderá ser utilizado no mapeamento fitogeográfico.

Futuras experiências deverão ser realizadas simulando-se a situação de campo, tomando-se as medidas em diferentes condições de iluminação solar (radiância), temperatura e umidade ambiente. Para uma melhor correlação entre o estado de saúde da planta com a atividade fotosintética e com o espectro de fluorescência da clorofila será necessário a realização de um estudo sistemático para cada tipo de espécie vegetal, variando-se de forma controlada o tipo de estresse ocasionado à planta.

De posse de todo o conjunto de dados obtidos, acreditamos ser possível utilizar o equipamento aqui descrito na identificação remota do estado de estresse e da atividade fotossintética da vegetação sobre toda uma região de estudo, o qual associado a um GPS poderá fornecer o mapeamento do recurso natural.

6 Referências

- LICHTERTHALER, H.K.; STOBER F.; LANG, M. "The Nature of Laser Induced Fluorescence Signature in Plants". **EARSEL ADV. IN REMOTE SENSING**, 1, 20, 1992.
- BARBINI, R.; COLAO, F.; FANTONI R., PALUCCI A., RIBIZZO S. "Report of second LASFLEUR field campaign for remote sensing of vegetation health: ENEA contribution". **ENEA RT/INN/93/17**.
- K.P. GUNTHER AND M. KLEMP-HOPTNER - **Laser Focus World**, August 1994 s17.
- K.P. GUNTHER, G.K. SCHMUCK. "Final Report of the EUREKA project LASFLEUR (EU380)" **ECSC-EEC-EAEC Brussels**, Cat. number: L-NA-15411-EN-C, 1993.
- KRAUSE G.H. AND WEISS E. "Chlorophyll Fluorescence and photosynthesis: the basics". **Annu. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Brol.** 42, p.31-349, 1991.