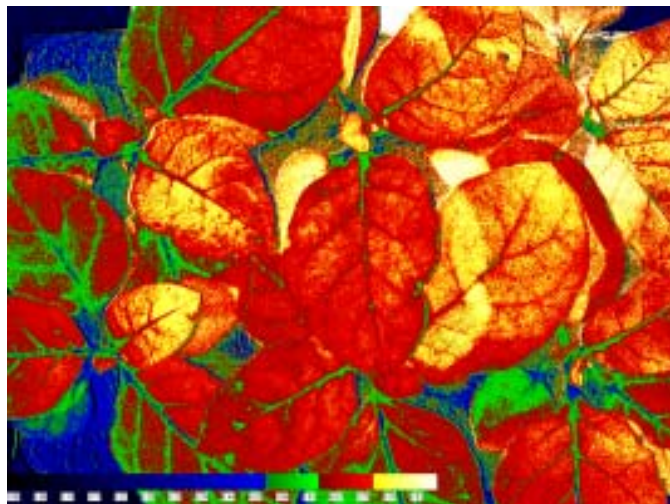




**Πολυτεχνείο Κρήτης τμήμα Ηλεκτρονικών
Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών**

Διπλωματική εργασία Πάντου Μηνά

**Θέμα: «Φασματική απεικόνιση για την ποσοτική
χαρτογράφηση δομικών χαρακτηριστικών φυτών
διαγνωστικής σημασίας: Εφαρμογή στην
φυτοπαθολογία»**



Επιτροπή:

**Μπάλας Κώστας (επιβλέπων)
Ζερβάκης Μιχάλης
Σταυρακάκης Γιώργος**

Χανιά, Δεκέμβριος 2004

Αφιερώνεται

***στον Σταύρο, στην Τούλα, στην Γεωργία
στους συντρόφους μου από το Πολυτεχνείο***

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Κώστα Μπάλα για την βοήθεια του στην εκπλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας και για την συμβολή του στην εμπάθυση και ανάπτυξη της επιστημονικής μου εκπαίδευσης.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τους Αντώνη Μακρή και Σωτήρη Καμπράνη (βιολόγοι - ερευνητές στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων) για την πολύτιμη βοήθεια τους στο στήσιμο της πειραματικής διαδικασίας και στην επιστημονική ανάγνωση και τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων, αυτής της εργασίας.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και μεταπτυχιακούς φοιτητές του τμήματος ΗΜΜΥ του Πολυτεχνείου Κρήτης, Αντώνη Ποτηράκη και Μανώλη Παπαδάκη για την βοήθεια τους στην εκτέλεση των πειραμάτων και συνολικότερα για την βοήθεια που μου προσέφεραν για την εκπλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή σελ. 1

Κεφάλαιο 1^ο - Δομικά χαρακτηριστικά του φύλλου – Φυσιολογία, Παθήσεις των χρωμοφόρων

- Εσωτερική δομή του φύλλου σελ. 5
- Θεωρητικό πρότυπο φύλλων σελ. 6
- Ρόλος των χρωστικών ουσιών φύλλων σελ. 7
- Σχέση οπτικών ιδιοτήτων και δομικών χαρακτηριστικών σελ. 8
- Βιβλιογραφία σελ. 11

Κεφάλαιο 2^ο - Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και η αλληλεπίδρασή της με την ύλη και τους φυτικούς ιστούς

- Κύρια τμήματα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος σελ. 13
- Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας Ύλης – Φασματοσκοπία σελ. 14
 - Απορρόφηση της ακτινοβολίας σελ. 14
 - Εκπομπή της ακτινοβολίας σελ. 15
 - Ανάκλαση και σκέδαση της ακτινοβολίας σελ. 16
- Είδη Φασματοσκοπίας σελ. 18
- Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με τους φυτικούς ιστούς σελ. 20
- Ανάκλαση και εκπομπή ακτινοβολίας από τα φύλλα σελ. 22
- Απορρόφηση στο υπέρυθρο σελ. 22
- Βιβλιογραφία σελ. 24

Κεφάλαιο 3^ο - Επεμβατικές και μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση του περιεχομένου σε χλωροφύλλη των φυτικών ιστών.

- Επεμβατικές μέθοδοι σελ. 25
- Μη επεμβατικές μέθοδοι σελ. 27
 - Hyperspectral imaging σελ. 27
 - Το φασματόμετρο απεικόνισης σελ. 28
 - Φασματική ανάκλαση σελ. 28
 - Hyperspectral imaging vs. Multispectral imaging σελ. 29
 - Επίγεια και υπέργεια μέσα επισκόπησης σελ. 30
 - Τηλεπισκόπηση(Remote Sensing) σελ. 31
 - Αεροφωτογραφία σελ. 33
 - Δορυφορικά Συστήματα Απεικόνισης σελ. 37
 - Βιβλιογραφία σελ. 40

Κεφάλαιο 4^ο - Φασματοσκοπική απεικόνιση, περιγραφή πειραματικής διάταξης και πειραματικής διαδικασίας

- Φασματοσκοπία σελ. 41
- Πειραματική διάταξη σελ. 44

▪ Διαχωριστική ικανότητα και δειγματοληψία	σελ. 47
▪ Ψηφιακές εικόνες	σελ. 48
▪ Πειραματική διαδικασία	σελ. 50
▪ Βιβλιογραφία	σελ. 51

Κεφάλαιο 5° - Χημική χαρτογράφηση, παρουσίαση των αποτελεσμάτων

▪ Εισαγωγικά	σελ. 52
▪ Χημική χαρτογράφηση (chemical imaging)	σελ. 54
▪ Αλγόριθμοι για την ποσοτική εκτίμηση του περιεχομένου σε χρωμοφόρες (χλωροφύλλη, καροτενοειδή).	σελ. 54
▪ Χλωροφύλλη	σελ. 55
▪ Καροτενοειδή	σελ. 57
▪ Αποτελέσματα	σελ. 59
▪ Φάσματα	σελ.59
▪ Διαγράμματα αποδόμησης της χλωροφύλλης	σελ.62
▪ Χαρτογραφημένες εικόνες	σελ. 66
▪ Συζήτηση	σελ. 93
▪ Βιβλιογραφία	σελ. 95
▪ Μελλοντικές βελτιώσεις	σελ. 96
Παράρτημα	σελ. 97

Συντομογραφίες-επεξήγηση

AOTF: Acousto Optic Tunable Filter

Car: Καροτενοειδή

Chl: Χλωροφύλλη

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HySI: HyperSpectral Imaging

IAS: Intercellular Air-Space

LCTF: Liquid Crystal Tunable Filter

LHC: Light Harvesting complex

ND: Normalized difference

PRI: Photochemical reflectance index

PSRI: Plant senescence reflectance index

RII: Reflectance integration index

SIPi: Structure insensitive pigment index

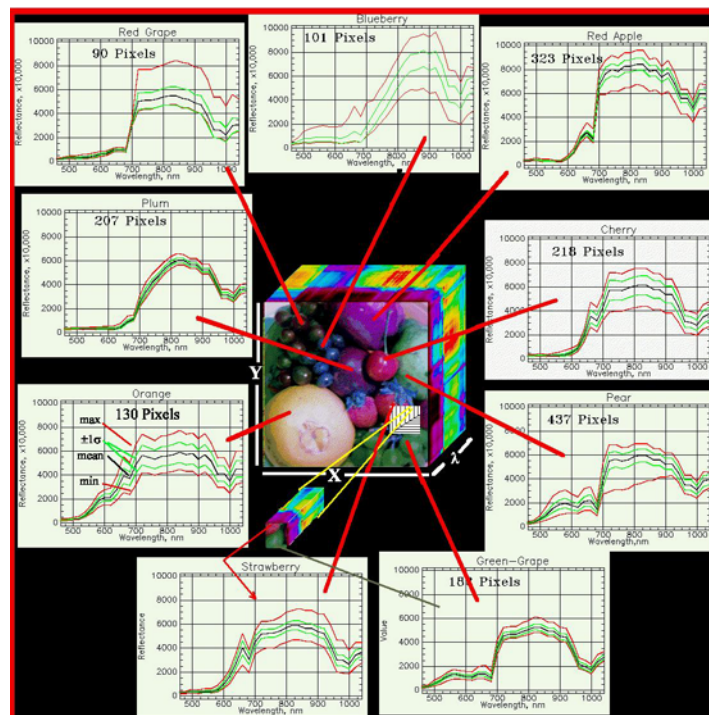
SR: Simple ratio

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματική απεικόνιση συνιστά μια μέθοδο εξαγωγής φασματικών δεδομένων από το μελετώμενο φυτό, τα οποία επεξεργαζόμενα μας παρέχουν πληροφορίες για σημαντικές παραμέτρους που επηρεάζουν τη ζωή του φυτού σε βιοχημικό επίπεδο:

- συγκέντρωση βασικών συστατικών, όπως χλωροφύλλη, καροτενοειδή κλπ.
- παραμετροποίηση, άρα και έγκαιρη διάγνωση, ασθενειών και ιών σε καλλιέργειες.

Θα μπορούσαμε να περιγράψουμε την απεικονιστική φασματοσκοπία σαν μια μέθοδο που χρησιμοποιεί την εικόνα σαν ένα αισθητήριο για τον εντοπισμό διαφορετικών υλικών-ουσιών, καθώς κάθε ουσία αλληλεπιδρά με το φως και απορροφά διαφορετικά μήκη κύματος, δίνοντας μας τη δυνατότητα να εντοπίσουμε αυτά τα αντικείμενα βάσει της φασματικής τους απόκρισης.



Σε σχέση με άλλες μεθόδους διάγνωσης και μελέτης, έχει ορισμένα συγκριτικά πλεονεκτήματα που θα φανούν στη συνέχεια, αλλά πρέπει να τονίσουμε δύο πολύ σημαντικά στοιχεία:

- Η φασματοσκοπία είναι μη-επεμβατική μέθοδος, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό όταν αναφερόμαστε σε ζωντανούς οργανισμούς.
- Μπορεί να εφαρμοστεί τόσο για επιτόπιες έρευνες, όσο και για παρακολούθηση φαινομένων από απόσταση (remote sensing)

Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η φασματοσκοπική μελέτη της συμπεριφοράς φυτικών ιστών. Ουσιαστικά προτείνουμε μια νέα φασματοσκοπική διάταξη και μια νέα μη επεμβατική μέθοδο για την επιτόπια-επί του αγρού(in situ) εκτίμηση του περιεχομένου των φύλλων ενός φυτού, σε διάφορες φυτικές χρωστικές ουσίες, χρωμοφόρες(pigments), για την περαιτέρω διάγνωση διάφορων παθήσεων των φυτών. Το βασικότερο πρόβλημα στις υπάρχουσες φασματοσκοπικές, φασματομετρικές μεθόδους, που έχουν σαν στόχο την εκτίμηση της περιεκτικότητας των φύλλων σε διάφορες χρωμοφόρες, είναι η αδυναμία εύρεσης της περιεκτικότητας σε κάθε σημείο του φύλλου. Με άλλα λόγια οι μέχρι σήμερα προτεινόμενες μέθοδοι βρίσκουν μια μέση τιμή της περιεκτικότητας των χρωμοφόρων, το οποίο από τη μία δεν ανταποκρίνεται με ακρίβεια στην πραγματικότητα και από την άλλη δεν μπορεί περαιτέρω να βοηθήσει σε εξαγωγή συμπερασμάτων για το πως εξελίσσονται διάφορες παθήσεις των φύλλων και με ποιόν τρόπο επεκτείνονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των φύλλων.

Απάντηση στο παραπάνω πρόβλημα αποτελεί η χαρτογράφηση των φύλλων του εξεταζόμενου φυτού ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε χρωμοφόρες (chemical mapping). Δηλαδή η ομαδοποίηση και κατηγοριοποίηση περιοχών του φύλλου που έχουν περίπου την ίδια περιεκτικότητα σε χρωμοφόρες και η προβολή τους πάνω στο φύλλο με έναν ψευδοχρωματικό κώδικα. Για να είναι αυτό εφικτό θα πρέπει τα φασματοσκοπικά δεδομένα που θα λάβουμε να έχουν μεγάλη χωρική πληροφορία, πράγμα που θα επιτρέπει την αξιοποίηση κάθε pixel της φασματοσκοπικής(φασματικής) εικόνας. Το συγκεκριμένο πρόβλημα το λύσαμε με τη βοήθεια μιας πρωτότυπης φασματικής (hyperspectral) κάμερας, ή οποία συγκεντρώνει μια πλειάδα απεικονιστικών μεθόδων(ανάκλαση, φθορισμός κτλ) και φασματικών ζωνών(spectral bands) από το υπεριώδες μέχρι το υπέρυθρο του οπτικού φάσματος(420-1000 nm). Παρόλη τη μικρή φασματική ανάλυση, η κάμερα έχει μεγάλες διαγνωστικές δυνατότητες γιατί πολύ μεγάλη χωρική πληροφορία(10^6 φάσματα).

Βασικές χρωστικές των φυτών(essential pigments)

Οι χλωροφύλλες (Chl) και τα καροτενοειδή (Car) είναι οι βασικές χρωστικές ουσίες(χρωμοφόρες) των ιστών των ανώτερων φυτών αρμόδιες για τις παραλλαγές του χρώματος από το σκούρο πράσινο έως το κίτρινο.

Το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη, την κυρίαρχη χρωστική ουσία των πράσινων φύλλων, καθορίζει σε μια μεγάλη έκταση το ποσό της φωτοσυνθετικής ενεργής ακτινοβολίας(Photosynthetic Active Radiation) που απορροφάται από το φύλλο, το φωτοσυνθετικό ποσοστό και την παραγωγικότητα του φύλλου. Τα καροτενοειδή συμμετέχουν στην συγκομιδή φωτός(light harvesting) και σε άλλες σημαντικές φυσικές λειτουργίες, όπως την παρεμπόδιση, μέσω διάφορων μηχανισμών, των καταστροφών στα φύλλα του φυτού προκαλούμενες από τις υπερβολικές ροές της ορατής ακτινοβολίας.

Η ενέργεια που απορροφά η χλωροφύλλη από το φως μπορεί να μετατραπεί σε τρία πράγματα:

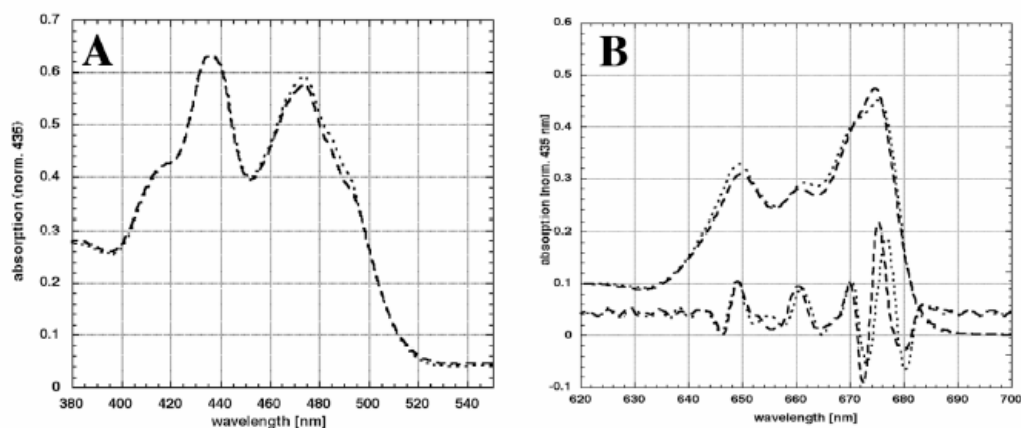
- A) ενέργεια για φωτοσύνθεση
- B) θερμότητα
- Γ) ανακλώμενο φως

Το πρωτεϊνικό συγκρότημα Light-Harvesting complex II

Το σημαντικότερο light-harvesting complex (LHC-II) των ανώτερων φυτών διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην απορρόφηση φωτεινής ενέργειας για τη φωτοσύνθεση και στη ρύθμιση της ροής της ενέργειας των φωτοσυνθετικών μηχανισμών. Το φυσικό LHC-II που απομονώθηκε από τον ιστό φυτών αποτελείται από τρία ισόμορφα (isoforms), Lhcb1, Lhcb2 και Lhcb3. Ο κύριος ρόλος των Lhcb1 και Lhcb2 είναι στην προσαρμογή της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης στα διαφορετικά επίπεδα φωτός, ενώ ο πλέον πιθανός ρόλος του Lhcb3 είναι ως μεσάζων στην ενεργειακή μεταφορά φωτός από το κύριο Lhcb1/Lhcb2 στον πυρήνα του Photo system II (PS II).

Τα πρωτεϊνικά συγκροτήματα χρωστικών ουσιών light-harvesting (LHCs) στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών είναι οι πιο αποδοτικοί συλλέκτες της ηλιακής ενέργειας. Αντίθετα από το κέντρο αντίδρασης, συγκροτήματα στα οποία η χλωροφύλλη (Chl) α είναι η μόνη πράσινη χρωστική ουσία, τα LHCs περιέχουν καθορισμένα ποσά και Chl α και Chl β, και επομένως αναφέρεται συχνά ως Chl α/β. Το συγκρότημα LHC-II, το πλουσιότερο σε Chl α/β, από μόνο του υπολογίζεται κατά προσέγγιση στο ένα τρίτο της συνολικής πρωτεϊνικής μεμβρανών στα θυλακοειδή των φυτών.

Η ανάλυση HPLC (High Performance Liquid Chromatography) αποκάλυψε ότι κάθε LHC-II μονομερές δεσμεύει 7-9 χλωροφύλλες α, 5-7 χλωροφύλλες β, δύο luteins και ένα neoxanthin, συν μικρά ποσά violaxanthin.



Διάγραμμα απορρόφησης LhcII (monomer)

Η διπλωματική εργασία χωρίζεται σε πέντε κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο θα περιγράψουμε τα δομικά και μικροδομικά χαρακτηριστικά των φύλλων των φυτών και την φυσιολογία τους και θα αναλύσουμε τις καταστάσεις και τις παθήσεις των φυτών που εκφράζονται

μέσω της μεταβολής της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης ή άλλων χρωμοφόρων ουσιών.

Στο δεύτερο κεφάλαιο θα ασχοληθούμε με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και την αλληλεπίδραση της με την ύλη(ανάκλαση, φθορισμός, σκέδαση, απορρόφηση, νόμος του Beer).

Στο τρίτο κεφάλαιο θα αναλύσουμε επεμβατικές(βιοχημικές μετρήσεις) και μη-επεμβατικές(υπερφασματική απεικόνιση, φασματομετρία) μεθόδους ποσοτικής ανάλυσης των χρωμοφόρων.

Στο τέταρτο κεφάλαιο θα περιγράψουμε την ανάγκη φασματοσκοπικής μελέτης των φυτών. Περαιτέρω θα περιγράψουμε την πειραματική διάταξη.

Στο πέμπτο κεφάλαιο θα αναλύσουμε τις έννοιες της φασματικής χαρτογράφησης και του chemical mapping και θα παρουσιάσουμε την πειραματική διαδικασία και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων και μια συζήτηση γύρω από αυτά.

Τέλος θα μιλήσουμε τις περαιτέρω μελλοντικές βελτιώσεις τόσο στην πειραματική διαδικασία όσο και στον πειραματικό εξοπλισμό.

Βιβλιογραφία

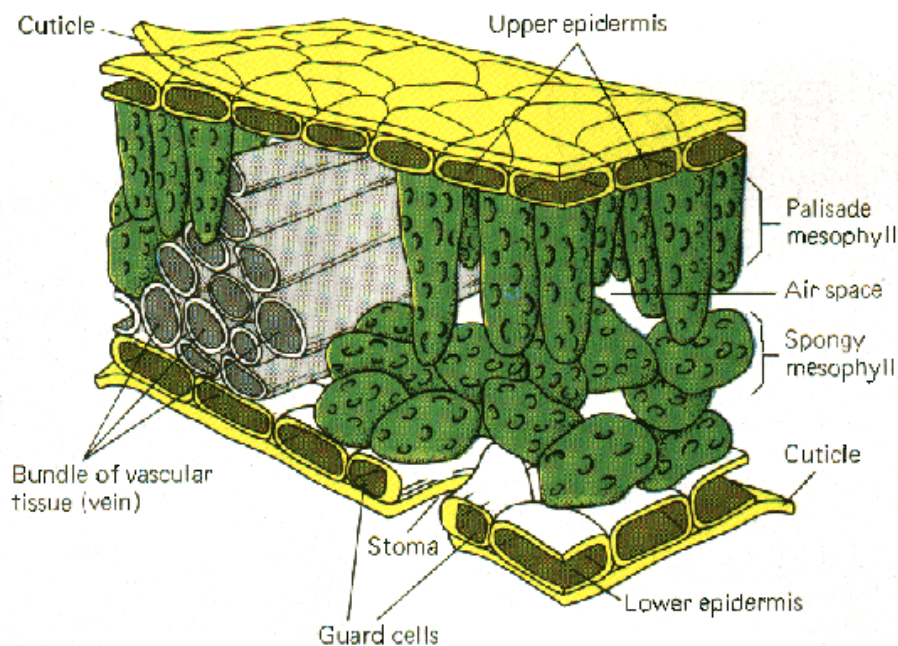
1. A. Ruban, A. Pascal, B. Robert, Xanthophylls of the major photosynthetic light-harvesting complex of plants: identification, conformation and dynamics, *FEBS Letters* 477 (June 2000) 181-185
2. Standfuss, J. and Kühlbrandt, W., The three isoforms of the light-harvesting complex II - Spectroscopic features, trimer formation, and functional roles., *J. Biol. Chem.* 279 36884-36891 (2004).

Κεφάλαιο 1^ο

Δομικά χαρακτηριστικά του φύλλου – Φυσιολογία, Παθήσεις των χρωμοφόρων

Εσωτερική δομή του φύλλου

Αρχικά θα περιγράψουμε εν συντομία την εσωτερική δομή ενός απλού δικοτυλήδονου φυτού, διότι θα μας βοηθήσει στην περαιτέρω κατανόηση της σχέσης των δομικών χαρακτηριστικών ενός φύλλου και του συντελεστή ανάκλασης.



(Σχήμα 1)

α)Επιδερμίδα(cuticle): Κέρινο στρώμα που καθιστά αδιάβροχο το ανώτερο μέρος του φύλλου.

β)Ανώτερη επιδερμίδα(Upper epidermis): Ανώτερο στρώμα των κυττάρων. Κανένας χλωροπλάστης. Προστασία για το φύλλο.

γ)Mesophyll(palisade mesophyll): Στενά συσκευασμένο ανώτερο στρώμα του χλωροπλάστη που περιέχει τα κύτταρα.

δ)Σπογγώδες mesophyll(spongy mesophyll): Χαμηλότερο στρώμα του χλωροπλάστη που περιέχει τα κύτταρα. Περιβάλλονται από διάκενα αέρα(IAS).

ε)Χαμηλότερη επιδερμίδα(lower epidermis): Χαμηλότερο εξωτερικό στρώμα των κυττάρων στο φύλλο.

στ)Αγγειακή δέσμη(vascular bundle): Δέσμη πολλών αγγείων(ξύλημα και φλοιώμα) για τη μεταφορά.

ζ)Ξύλημα(xylem): Αγγειακό σύστημα διαβίωσης, που μεταφέρει νερό και μεταλλικά στοιχεία σε όλο το φυτό.

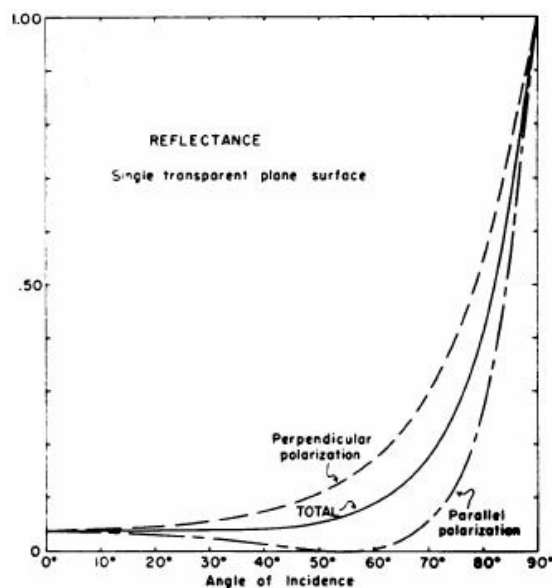
η) **Φλοίοωμα(phloem)**: Αγγειακό σύστημα διαβίωσης που μεταφέρει τις διαλυμένες ζάχαρες και τις οργανικές ενώσεις σε όλο το φυτό.

θ) **Κύτταρα φρουροί(guard cells)**: 2 κύτταρα που περιβάλλουν το stomata, και ελέγχουν το ποσοστό ανταλλαγής αερίου και νερού.

ι) **Stomata**: Άνοιγμα μεταξύ των κυττάρων φρουράς για ανταλλαγή αερίου και νερού.

Αλληλεπίδραση ενός πρότυπου φύλλων με το φως.

Ένα φύλλο μπορεί να θεωρηθεί σαν μια διάχυτη και χρωματισμένη δομή(mesophyll) που έχει διαφανείς μεμβράνες(epidermis) και στις δύο επιφάνειες. Η μεμβράνη στο πίσω μέρος του φύλλου είναι ουσιαστικά χωρισμένη από τη διάχυτη και χρωματισμένη πλευρά από ένα διάκενο αέρα, έτσι και οι εσωτερικές και οι εξωτερικές επιφάνειες αυτής της πίσω επιδερμίδας μπορούν να ανακλούν και να διαθλούν το φως. Η μπροστινή επιδερμίδα, εντούτοις, είναι συνδεδεμένη με mesophyll για το μεγαλύτερο μέρος της εσωτερικής επιφάνειάς του, έτσι ώστε το φως, μόλις περάσει από την εξωτερική επιδερμική επιφάνεια, να μπορεί να περάσει εύκολα στο κέντρο του φύλλου. Κατά συνέπεια, το φως προκειμένου να εκπεμφθεί ή να απορροφηθεί στο πίσω μέρος του φύλλου πρέπει να διέλθει μέσω δύο επίπεδων διεπαφών, ενώ για να απορροφηθεί ή να εκπεμφθεί στο μπροστινό μέρος πρέπει να διέλθει μόνο μιας τέτοιας διεπαφής. Κάθε μία από αυτές τις διεπαφές έχει πολύ μεγαλύτερη επίδραση στο πλάγιο φως από ότι μια κανονική επιφάνεια.



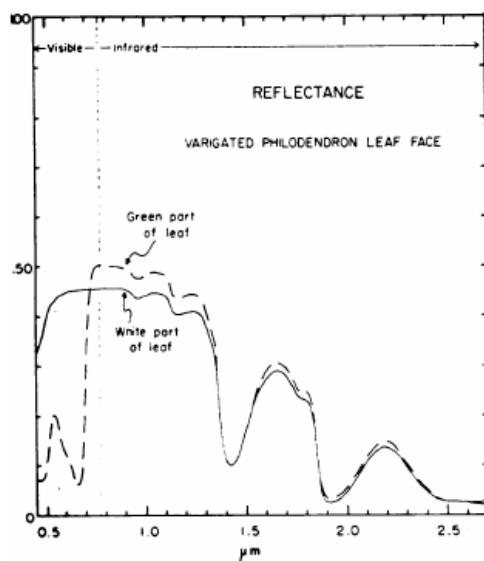
Θεωρητικός συντελεστής ανάκλασης από μια ενιαία διαφανή επίπεδη επιφάνεια. Οι τρεις καμπύλες είναι για πολωμένο φως με το ηλεκτρικό διάνυσμα κάθετο στην επιφάνεια δοκιμής, πολωμένο φως, με το ηλεκτρικό διάνυσμα παράλληλο στην επιφάνεια δοκιμής, και το σύνολο του μη πολωμένου φωτός.(σχήμα 2)

Επομένως, μια παράλληλη ακτίνα φωτός (όπως αυτή στην φασματοφωτομετρία)κανονική προς το φύλλο μπορεί να εισαχθεί σε καθεμία πλευρά του φύλλου με μικρή αρχική ανάκλαση. Μέσα στο φύλλο το φως διαχέεται, και η πίσω επιφάνεια είναι μεγαλύτερο εμπόδιο στη διαφυγή μιας πλάγιας φωτεινής δέσμης από ότι είναι η μπροστινή. Όταν μια πλάγια φωτεινή δέσμη προσκρούσει στο φύλλο από την εξωτερική πλευρά ανακλάται περισσότερο από την πίσω επιδερμίδα απ' ότι από την μπροστινή επιδερμίδα. Αυτή η επιλεκτική επίδραση στις δύο επιφάνειες των φύλλων υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι οι επιδερμίδες κατά ένα μεγάλο μέρος δεν

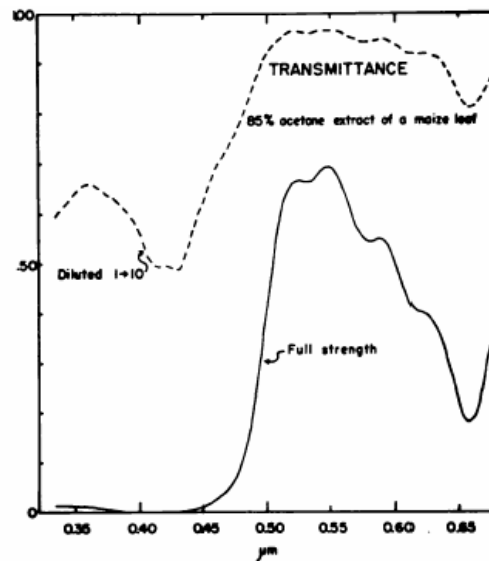
περιέχουν χρωμοφόρες(unpigmented), εφόσον το φως από μια πηγή στην πίσω πλευρά του φύλλου μπορεί να διαπεράσει την πίσω επιδερμίδα και να ανακλαστεί από την εσωτερική επιφάνεια αυτής της επιδερμίδας χωρίς να αλληλεπιδράσει με την χλωροφύλλη ή άλλες χρωμοφόρες ουσίες. Κατά ένα μεγάλο μέρος, λόγω αυτών των παραγόντων το πίσω μέρος των φύλλων είναι χλωμό και τα φύλλα εμφανίζεται να ανακλούν περισσότερο(και να εκπέμπουν λιγότερο)όταν η μπροστινή τους πλευρά είναι προς το φως. Οι αυξημένες φλέβες στα πίσω μέρη των φύλλων τείνουν επίσης να μετατοπίσουν τη μέση επιφάνεια των φύλλων μακριά από τη σφαίρα ενσωμάτωσης της φασματοφωτομετρίας όταν το πίσω μέρος των φύλλων είναι προς τη σφαίρα. Αυτή η επίδραση, επίσης, οδηγεί σε μικρότερο ποσοστό ανάκλασης για το πίσω μέρος απ' ότι για το μπροστινό και μικρότερο ποσοστό εκπομπής για το μπροστινό απ' ότι για το πίσω.

Ρόλος των χρωστικών ουσιών των φύλλων

Όπως αναμένεται, και όπως και άλλοι έχουν παρατηρήσει, η έλλειψη ισχυρής ανάκλασης στην ορατή περιοχή του οπτικού φάσματος από τα περισσότερα φύλλα μπορεί να αποδοθεί στις χρωστικές ουσίες των φύλλων, που απορροφούν το ορατό φως. Το σχήμα 3 δείχνει ότι, όπως ήταν καταδειγμένο και από τον Knipling, φύλλα που στερούνται τις συνηθισμένες χρωστικές ουσίες ανακλούν μεγάλο ποσό του ορατού φωτός ακριβώς όπως ανακλούν και το κοντινό υπέρυθρο. (Το άσπρο μέρος του φύλλου του σχήματος 3 ήταν λεπτότερο από το πράσινο μέρος και επομένως ανακλά μικρότερο ποσό υπέρυθρου φωτός). Το σχήμα 4 επιβεβαιώνει ότι χρωστικές ουσίες που έχουν χαρακτηριστικό χρώμα μπορούν να εξαχθούν από το φύλλο. Αυτές οι χρωστικές ουσίες παρουσιάζουν μικρή απορρόφηση στο υπέρυθρο. Το αποσπασματικό υλικό απορροφά έντονα στο υπεριώδες και στο ιώδες, και σε αυτά τα μήκη κύματος το φύλλο δεν έχει μικρό συντελεστή ανάκλασης και σχεδόν καθόλου εκπομπή.



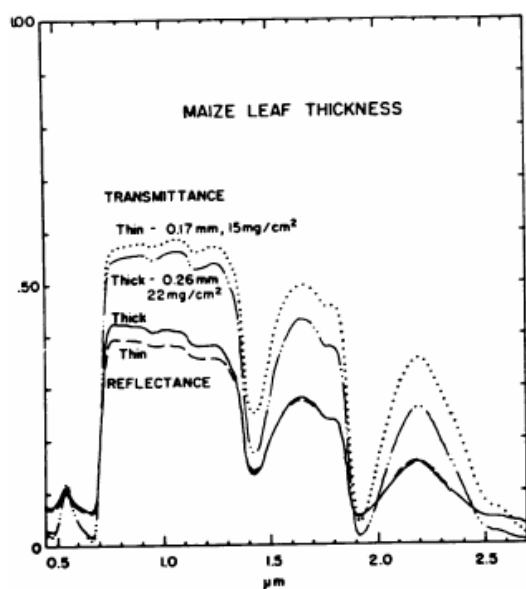
(Σχήμα 3)



(Σχήμα 4)

Ρόλος του πάχους φύλλων

Ο συντελεστής ανάκλασης ενός φύλλου γενικά δεν είναι έντονα εξαρτώμενος από το πάχος των φύλλων, μέσα στο συνηθισμένο εύρος πάχους (σχήμα 5). Η εκπομπή επηρεάζεται εντονότερα από το πάχος των φύλλων, ειδικά σε μερικά μήκη κύματος, όπου οι χρωστικές ουσίες των φύλλων απορροφούν την ενέργεια.



(Σχήμα 5)

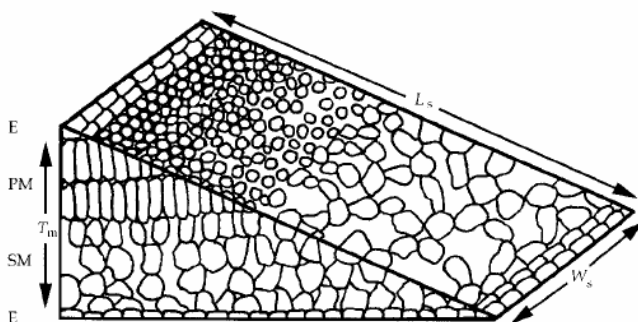
Σχέση οπτικών ιδιοτήτων και δομικών χαρακτηριστικών

Οι οπτικές ιδιότητες των φύλλων έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζονται με τη φωτοσυνθετική απόδοσή τους και με τα αποθέματα θερμικής ενέργειας (Gates, 1976 Ehleringer και Mooney, 1978). Επιπλέον, η κατανόηση των δομικών τμημάτων των φύλλων που επηρεάζουν το συντελεστή ανάκλασης του φύλλου, είναι σημαντική για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των φασματοσκοπικών μετρήσεων. Ο συντελεστής ανάκλασης των φύλλων στη κοντινή υπέρυθη (near-infrared) περιοχή (NIR 750-1350 nm) επηρεάζεται πρώτιστα από τη δομή των φύλλων, εκτιμώντας ότι ο συντελεστής ανάκλασης στην ορατή περιοχή (400-700 nm) καθορίζεται συνήθως από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες, και ο συντελεστής ανάκλασης στη μέση-υπέρυθη περιοχή (1350-2500 nm) από την περιεκτικότητα σε νερό (Gates et Al, 1965). Στη μετάβαση από το κόκκινο στα υπέρυθρα μήκη κύματος, ο συντελεστής ανάκλασης των φύλλων αυξάνεται πολύ, παράγοντας ένα ευδιάκριτο φασματικό χαρακτηριστικό γνώρισμα το οποίο ονομάζεται κόκκινη άκρη (red edge). Ο προσδιορισμός της θέσης αυτής της άκρης, έχει συσχετιστεί με την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη, με τα στάδια ανάπτυξης του φυτού, όπως και με την καταπόνηση του φυτού (Vogelmann, 1993 Gitelson, Lang and Lichtenthaler, 1996). Αντίθετα, η ανάλυση του συντελεστή ανάκλασης φύλλων μέσα στην NIR περιοχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αξιολογήσει την επίδραση των δομικών ιδιοτήτων των φύλλων στο συντελεστή ανάκλασης, σε αντιδιαστολή με τα χημικά συστατικά του φύλλου όπως η χλωροφύλλη και το νερό (Gates, 1970 Curran et Al, 1992).

Πολλά χαρακτηριστικά της δομής των φύλλων μπορούν να συμβάλουν στο συντελεστή ανάκλασης της υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα φύλλα. Μέσα σε ένα φύλλο, το φως είναι διεσπαρμένο στις διεπαφές των τοίχων των κυττάρων και του μεσοκυττάριου διάκενου αέρα (IAS), λόγω μιας μεγάλης αλλαγής στο διαθλαστικό δείκτη από 1,00 έως 1,33, αντίστοιχα. Ο υπέρυθρος συντελεστής ανάκλασης από τα φύλλα έχει καταδειχθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι επηρεάζεται ιδιαίτερα από την αναλογία της mesophyll επιφάνειας κυττάρων (A_{mes}) που εκτίθεται στα μεσοκυττάρια διάκενα αέρα (IAS) εκφρασμένος ανά περιοχή μονάδων φύλλων (A) (Knipling, 1970 Terashima and Saeki, 1983 DeLucia et Al, 1996). Αυτή η αναλογία (A_{mes}/A) είναι επίσης έντονα συνδεδεμένη με τη φωτοσυνθετική απόδοση των φύλλων σε πολλά είδη.

Υπάρχουν πολλά άλλα χαρακτηριστικά της δομής των φύλλων που έχουν συνδεθεί με τις αλλαγές στο συντελεστή ανάκλασης NIR. Παραδείγματος χάριν, οι Vogelmann και Martin (1993) έδειξαν ότι μακριά, κυλινδρικά περιφραγμένα mesophyll κύτταρα (PM) διαδίδουν τα ορατά μήκη κύματος βαθύτερα στο εσωτερικό των φύλλων, εκτιμώντας ότι τα πιο σφαιρικά σπογγώδη mesophyll κύτταρα (SM) τείνουν να σκεδάσουν την ακτινοβολία. Γενικά, τα SM κύτταρα μπορεί επίσης να έχουν περισσότερες διεπαφές ανάμεσα στο κυτταρικό τοίχωμα και στα μεσοκυττάρια διάκενα αέρα, που ενεργούν για να απεικονίσουν το φως (Terashima and Saeki, 1983 DeLucia και Nelson, 1993). Κατά συνέπεια, φύλλα με μεγαλύτερη PM/SM αναλογία πάχους μπορούν να παγιδέψουν μεγαλύτερο ποσό από NIR ακτινοβολία και έχουν χαμηλότερες τιμές συντελεστή ανάκλασης NIR από την κοιλιακή επιφάνεια των φύλλων.

Διάφοροι παράγοντες εκτός από τις διεπαφές κυτταρικών τοιχωμάτων-IAS μπορούν επίσης να συμβάλλουν σημαντικά στο συντελεστή ανάκλασης NIR από τα φύλλα. Για παράδειγμα, η rubescence (χνοασμός) των φύλλων σε κάποια φυτικά είδη έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τον NIR συντελεστή ανάκλασης μέχρι 10% (Ehleringer, 1981), και τα κεριά στην επιφάνεια φύλλων έχουν αποδειχθεί επίσης ότι ενισχύσουν το συντελεστή ανάκλασης NIR από 5-20% (Reicosky, 1978 Mulroy, 1979). Οι παχύτερες επιδερμίδες φύλλων μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε μεγαλύτερο συντελεστή ανάκλασης φύλλων της ηλιακής ακτινοβολίας (Gates, 1970) και η αφαίρεση της χαμηλότερης επιδερμίδας ενός δίχρωμου φύλλου (κοιλιακή επιφάνεια μια ελαφρύτερη σκιά πράσινου από κοιλιακό) μειωμένο NIR συντελεστή ανάκλασης από την κοιλιακή επιφάνεια φύλλων κατά μέχρι 15% (Lin and Ehleringer, 1983).



Ένα αντιπροσωπευτικό τμήμα φύλλων που επεξηγεί τις παραμέτρους για τον υπολογισμό των A_{mes}/A και %IAS. Το μήκος της περιμέτρου των mesophyll κυττάρων (P_i) και ο τομέας των μεσοκυττάριων διάκενων αέρα, όπως φαίνεται στο παράδειγμα παραδερματικό τμήμα, μετρήθηκε για να δώσει A_{mes}/A και %IAS, αντίστοιχα. Συντμήσεις αριθμού: E,

επιδερμίδα L_s , μήκος του πλάγιου-*paradermal* τμήματος PM , *mesophyll* κύτταρα SM , σπογγώδες *mesophyll* T_m , *mesophyll* πάχος W_s , πλάτος του τμήματος. (Σχήμα 6)

Οι δομικές διαφορές (π.χ. πάχος φύλλου, πυκνότητα, αριθμός διεπαφών νερού- αέρα, πάχος επιδερμίδας, και το *rubescence*) μεταξύ των φύλλων μπορεί να έχουν σημαντικά αποτελέσματα στη σχέση δομή-συντελεστής ανάκλασης. Το φως που αντανακλάται άμεσα από την επιφάνεια του φύλλου δεν εισάγεται ποτέ στα κύτταρα των φύλλων και κατά συνέπεια δεν επηρεάζεται από τη χρωστική ουσία και την περιεκτικότητα σε νερό. Η ανάκλαση επιφάνειας μπορεί να ενισχυθεί πολύ από τον χνοασμό των φύλλων ή κεριών που βρίσκονται στη επιφάνεια. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο χνοασμός αυξάνει τον συντελεστής ανάκλασης σε όλη την ορατή περιοχή του φάσματος αλλά η επίδρασή του στο κοντινό υπέρυθρο είναι μεταβλητή. Τα κεριά αυξάνουν το συντελεστή ανάκλασης επιφάνειας σε όλη την ορατή περιοχή του φάσματος και στο κοντινό υπέρυθρο αν και η επίδραση είναι συχνά μέγιστη στα πιο μικρότερα μήκη κύματος λόγω της σκέδασης Rayleigh. Το φως που εισάγεται στο φύλλο ακολουθεί σύνθετη και απρόβλεπτη πορεία λόγω της εσωτερικής ανάκλασης και σκέδασης. Ο Fukshansky υπολόγισε το μέσο μήκος της πορείας του φωτός στο εσωτερικό ενός φύλλου να είναι από δύο έως τέσσερις φορές το πάχος του φύλλου. Αυτό οδηγεί στην διεύρυνση της παρατήρησης για τα μέγιστα σημεία απορρόφησης χρωστικών ουσιών *in vivo* σε σύγκριση με τις *in vitro* μετρήσεις. Τέλος, οι χρωστικές ουσίες δεν κατανέμονται ομοιογενώς στον ιστό των φύλλων έτσι ώστε ακόμη και το φως να ακολουθεί μια ισομήκη πορεία στο εσωτερικό του φύλλου μπορεί το φύλλο να περιέχει διαφορετικά ποσά χρωστικής ουσίας.

Παθήσεις φυτικών ιστών και σχέση με χρωμοφόρες – ποσοτικός προσδιορισμός χρωμοφόρων.

Το κύριο διαγνωστικό χαρακτηριστικό για οποιαδήποτε πάθηση των φυτικών ιστών, είτε προέρχεται από παθογόνο, ιογενή αιτία είτε από την αλληλεπίδραση με το εξωτερικό περιβάλλον είτε από τη γήρανση, είναι η αποδόμηση των χρωμοφόρων ουσιών του φυτικού ιστού και ιδιαίτερα της χλωροφύλλης και των καρωτενοειδών. Επίσης οποιαδήποτε οπτική αλλαγή στο χρώμα των φύλλων ή στην εξωτερική δομή οφείλεται σε έναν μεγάλο βαθμό στην αλλαγή της συγκέντρωσης χρωμοφόρων ουσιών. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για την εκτίμηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του περιεχομένου των φύλλων των φυτών, σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή.

Βιβλιογραφία

1. Joseph T. Wooley, Reflectance and Transmittance of light by leaves, *Plant Physiology* (1971), 656-662
2. Scott A. Samson, Optical properties of vegetation in the visible, near and shortwave infrared wavelengths, *Mississippi State University*
3. Michele R. Slaton, E. Raymond Hunt, Jr., William K. Smith, Estimating near-infrared leaf reflectance, from leaf structural characteristics, *American Journal of Botany* 88(2): 278-284, 2001.
4. Fukshansky L. A., Remisowsky A. M., McClendon, J., Ritterbusch A., Richter T., & Mohr H. (1993). Absorption spectra of leaves corrected for scattering and distributional error: a radiative transfer and absorption statistics treatment. *Photochemistry and Photobiology*, 57, 538– 555.
5. Gates, D. M., Physical and physiological properties of plants. *Remote Sensing with Special Reference to Agriculture and Forestry. National Academy of Sciences, Washington, D. C. pp. 224-252, (1970)*

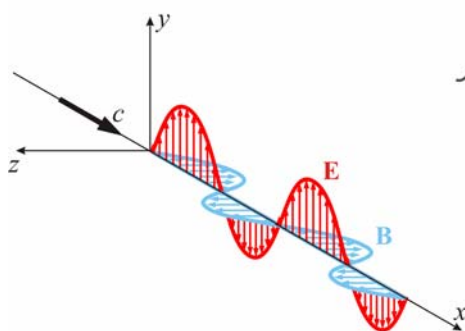
Κεφάλαιο 2^ο

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και η αλληλεπίδρασή της με την ύλη και τους φυτικούς ιστούς

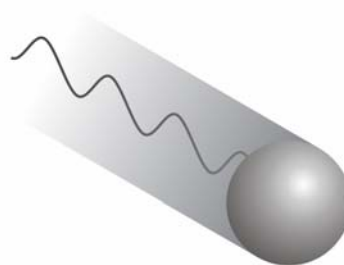
Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι ένας τύπος ενέργειας, ο οποίος μεταδίδεται στο χώρο με τεράστια ταχύτητα. Μπορεί να πάρει πολλές μορφές και οι πιο εύκολα αναγνωρίσιμες είναι το φως και η ακτινοβολούμενη θερμότητα. Λιγότερο αναγνωρίσιμες μορφές της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι οι ακτίνες χ, υπεριώδης ακτινοβολία, μικροκύματα κτλ.

Πολλές από τις ιδιότητες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μπορούν να περιγραφούν με τη βοήθεια του κυματικού μοντέλου, το οποίο περιλαμβάνει τις παρακάτω παραμέτρους: μήκος κύματος, συχνότητα, ταχύτητα και πλάτος. Σε αντίθεση με άλλα κυματικά φαινόμενα, όπως π.χ. ο ήχος, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία δεν χρειάζεται κανένα μέσο για τη μετάδοσή της, έτσι εύκολα περνάει μέσα από το κενό.

Το κυματικό μοντέλο δεν μπορεί να ερμηνεύσει φαινόμενα που έχουν να κάνουν με την απορρόφηση και την εκπομπή της ακτινοβολούμενης ενέργειας. Για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητο να αντιληφθούμε την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σαν μια συνεχή ροή διακριτών σωματιδίων ή κυματικών ενεργειακών «πακέτων» τα οποία λέγονται φωτόνια. Η ενέργεια ενός φωτονίου είναι ανάλογη με την συχνότητα της ακτινοβολίας. Αυτή η δυϊκή φύση της ακτινοβολίας, η σωματιδιακή και η κυματική, δεν αποκλείουν η μία την άλλη, αλλά αλληλοσυμπληρώνονται. Πράγματι, ο δυισμός αυτός αποδεικνύεται ότι εφαρμόζεται στην συμπεριφορά της ροής των ηλεκτρονίων ή άλλων βασικών σωματιδίων, όπως τα πρωτόνια, και είναι πλήρως εναρμονισμένος με την κυματική μηχανική.



**Κλασική θεώρηση:
Ηλεκτρομαγνητικό κύμα**



**Κβαντική θεώρηση:
Σώμα και κύμα**

Κύρια τμήματα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος

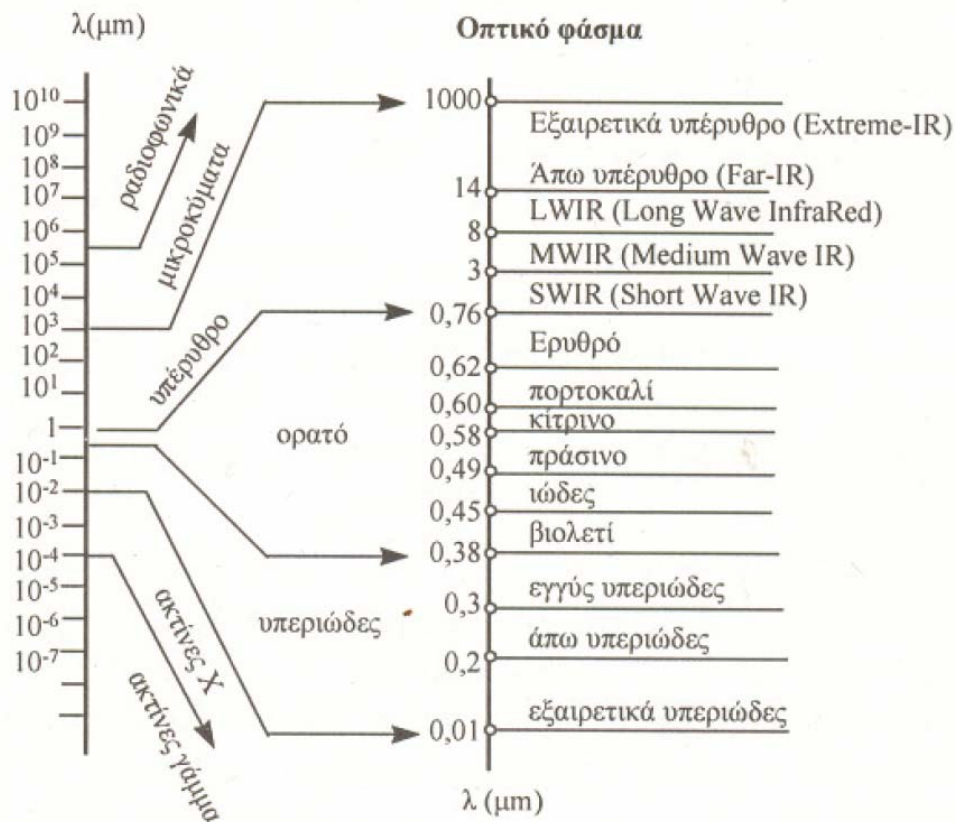
Ολόκληρο το εύρος των μηκών κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αποτελεί το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Για τον ήλιο το φάσμα αυτό εκτείνεται από τις ακτίνες γάμμα (μικρό μήκος κύματος και υψηλή ενέργεια) μέχρι τα ραδιοκύματα (μεγάλο μήκος κύματος και χαμηλή ενέργεια). Για λόγους ευκολίας, διακρίνουμε το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα σε ζώνες που παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά.

Μια φασματική ζώνη (spectral band) αποτελείται από κάποια καθορισμένη ομάδα φασματικών γραμμών, όπου κάθε φασματική γραμμή αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Οι φασματικές ζώνες του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μπορούν επιγραμματικά να χωριστούν στις ακόλουθες ομάδες σύμφωνα με το μήκος κύματος.

Φασματική Ζώνη	Μήκος Κύματος (λ)
Ακτίνες γάμμα	< 0,03 nm
Ακτίνες Χ	0,03 nm – 300 nm
Υπεριώδης ακτινοβολία	0,30 μm – 0,38 μm
Ορατό	0,38 μm – 0,72 μm
Εγγύς Υπέρυθρο	0,72 μm – 1,30 μm
Μέσο Υπέρυθρο	1,30 μm – 3 μm
Άπω Υπέρυθρο	7,00 μm – 15 μm
Μικροκύματα	0,3 cm – 30 cm
Ραδιοφωνικά κύματα	≥30 cm

Οι φασματικές ζώνες του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος του Ήλιου.

Οι κύριες διαιρέσεις του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ορίζονται στην ουσία αυθαίρετα, αφού μεταξύ συγκεκριμένων ζωνών του φάσματος υπάρχουν πολλές υποδιαιρέσεις (αποχρώσεις), επειδή η μετάβαση από τη μία ζώνη φάσματος στην άλλη είναι βαθμιαία και όχι απότομη.



Το ανακλώμενο φάσμα (reflective spectrum)-τα μήκη κύματος που μπορούν να ανακλαστούν και να διαθλασθούν με φακούς και κάτοπτρα-εκτείνεται από περίπου 0,38 μm μέχρι 30 μm και ορίζει το τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται στην Τηλεπισκόπηση.

Επίσης ως εικόνα(ή απεικόνιση) θεωρείται οποιαδήποτε φασματική καταγραφή ανεξάρτητα από το μήκος κύματος ή τη συσκευή που τη δημιουργεί. Ενώ φωτογραφία είναι η εικόνα που καταγράφεται σε μήκη κύματος από 0,3 μm έως 0,9 μm .

Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας Ύλης – Φασματοσκοπία

Η φυσική βάση της φασματοσκοπίας είναι η αλληλεπίδραση φωτός και ύλης πράγμα το οποίο εντοπίστηκε από τον Hertz κατά την διάρκεια ενός πειράματος ανακαλύπτοντας τυχαία το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο. Τα διάφορα είδη της οπτικής φασματοσκοπίας βασίζονται στα φαινόμενα της εκπομπής(emission), απορρόφησης(absorption), φθορισμού(fluorescence), φωσφορισμού(phosphorescence) και σκέδασης (scattering)

Απορρόφηση της ακτινοβολίας

Όταν η ακτινοβολία περάσει μέσα από ένα στρώμα στερεού, υγρού ή αερίου, συγκεκριμένες συχνότητες μπορεί επιλεκτικά να αφαιρεθούν εξαιτίας της απορρόφησης της ακτινοβολίας. Η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μεταφέρεται στα άτομα ή στα μόρια σχηματίζοντας το δείγμα, έτσι σαν αποτέλεσμα, αυτά τα σωματίδια προβιβάζονται από μια χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη σε μια υψηλότερη ενεργειακή στάθμη, ή αλλιώς διεγερμένη κατάσταση. Σε

θερμοκρασία δωματίου, οι περισσότερες ουσίες βρίσκονται στην χαμηλότερη ενεργειακή τους στάθμη ή αλλιώς στην αρχική τους κατάσταση. Η απορρόφηση συνήθως οδηγεί σε μετάβαση από την αρχική κατάσταση σε μια υψηλότερη ενεργειακή στάθμη, κατάσταση.

Τα άτομα, μόρια, ή ιόντα έχουν ένα περιορισμένο αριθμό διακριτών ενεργειακών καταστάσεων. Για να μπορέσει να λάβει χώρα η απορρόφηση, η ενέργεια του διεγερμένου φωτονίου πρέπει να ισούται ακριβώς με την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στην αρχική κατάσταση και στην υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση του σωματιδίου που θα απορροφήσει την ενέργεια. Αφού αυτές οι ενεργειακές διαφορές είναι μοναδικές για κάθε σωματίδιο, η μελέτη των συχνοτήτων απορρόφησης της ακτινοβολίας παρέχει ένα μέσο για τον χαρακτηρισμό των συστατικών ενός δείγματος υλικού. Για αυτόν τον λόγο η γραφική παράσταση της απορροφητικότητας σαν συνάρτηση του μήκους κύματος απορρέει πειραματικά.

Η γενική μορφή ενός φάσματος απορρόφησης εξαρτάται από την πολυπλοκότητα, την φυσική κατάσταση και το περιβάλλον του σωματιδίου που απορροφά.

Εκπομπή της ακτινοβολίας

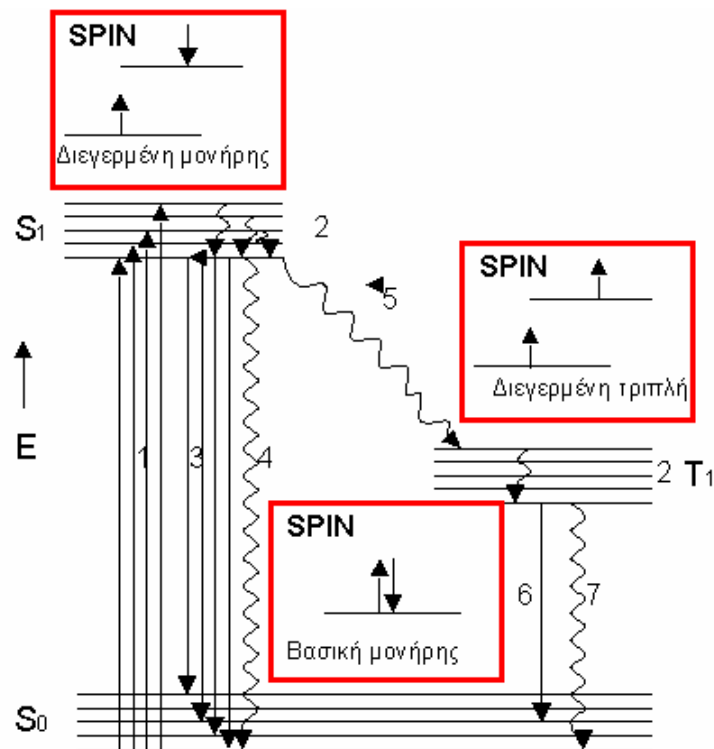
Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία παράγεται όταν διεγερμένα σωματίδια(ιόντα, άτομα, μόρια) επιστρέφουν σε χαμηλότερα επίπεδα ενέργειας ή στην αρχική τους κατάσταση. Η διέγερση μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους όπως: βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια ή άλλα σωματίδια, έκθεση σε μεγάλη θερμοκρασία, απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Τα ακτινοβολούντα σωματίδια που είναι πλήρως διαχωρισμένα το ένα από το άλλο, συμπεριφέρονται σαν ανεξάρτητα σώματα και συχνά παράγουν ακτινοβολία που περιέχει μόνο συγκεκριμένα μήκη κύματος. Έτσι το παραγόμενο φάσμα είναι ασυνεχές και ονομάζεται *line spectrum*. Από την άλλη πλευρά, το συνεχές φάσμα είναι αυτό στο οποίο αναπαριστούνε όλα τα μήκη κύματος. Συνεχή φάσματα παράγονται από την διέγερση α) στερεών ή υγρών, στα οποία τα άτομα είναι τόσο κοντά ώστε να μην μπορούν να έχουν ανεξάρτητη συμπεριφορά β)πολύπλοκων μορίων τα οποία έχουν πολλές στενά συνδεδεμένες ενεργειακές καταστάσεις.

Τόσο τα *line spectrum* όσο και τα συνεχή φάσματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά. Τα συνεχή φάσματα βρίσκουν εφαρμογές στην φασματοφωτομετρία και τα *line spectrums* επιτρέπουν τον καθορισμό και την αναγνώριση των ακτινοβολούντων υλικών.

Στην περίπτωση της εκπομπής έχουμε δύο διαφορετικές διεργασίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά: τον **φθορισμό**(fluorescence) και τον **φωσφορισμό**(phosphorescence). Η βασική διαφορά μεταξύ φθορισμού και φωσφορισμού είναι ο χρόνος που διαρκεί η ακτινοβολία μετά την διέγερση. Στην πρώτη περίπτωση ο χρόνος αυτός είναι της τάξης των 10^{-8} sec ενώ στην δεύτερη από 10^{-5} sec έως 10 sec. Η ερμηνεία των δυο φαινομένων δίνεται σχηματικά με το γνωστό ως διάγραμμα Jablonski, όπου με

παράλληλες γραμμές συμβολίζουν η βασική και οι διάφορες διεγερμένες ενεργειακές στάθμες.



Ανάκλαση και σκέδαση της ακτινοβολίας

Όταν η ακτινοβολία περνά από ένα μέσο αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ουσίες με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης, παρατηρούμε το φαινόμενο της ανάκλασης. Το ποσοστό της ανάκλασης αυξάνεται με την αύξηση της διαφοράς στους δείκτες διάθλασης. Για μια δέσμη που ταξιδεύει κανονικά σε μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης, το ανακλώμενο ποσό δίνεται από τη σχέση:

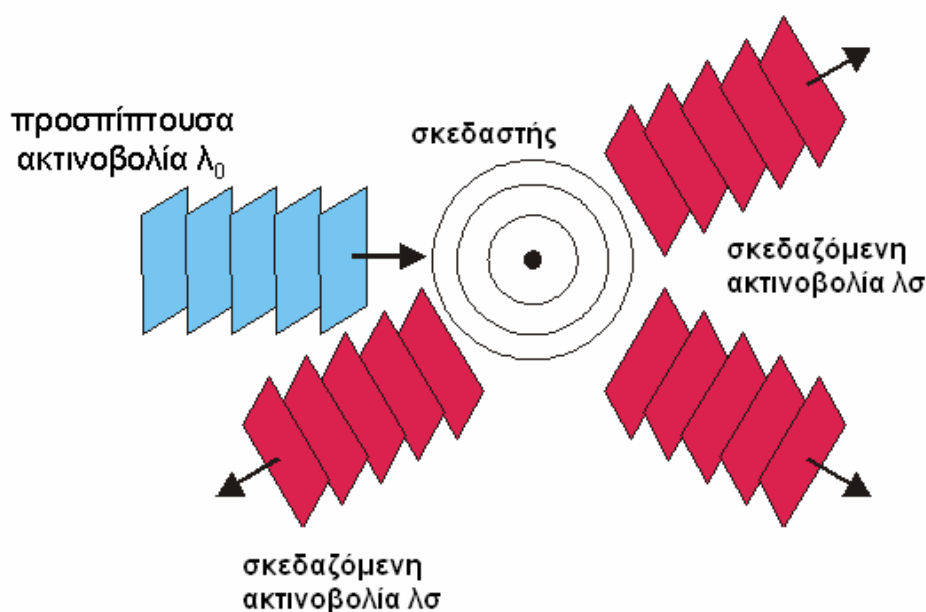
$$I_r / I_0 = (n_2 - n_1)^2 / (n_2 + n_1)^2$$

Όπου I_0 είναι η ένταση της ακτίνας και I_r είναι η ανακλώμενη ένταση. Τα n_1 και n_2 είναι οι συντελεστές διάθλασης των δύο υλικών.

Η απορρόφηση ενέργειας από ένα σύστημα (σκεδαστής) από ένα προσπίπτον φωτόνιο και η επανεκπομπή μέρους της ενέργειας του παραπάνω φωτονίου από το ίδιο σύστημα ορίζεται σαν σκέδαση. Το φαινόμενο της σκέδασης εξαρτάται από την φύση του σκεδαστή (υλικό, μέγεθος) και την διάταξη του στο χώρο (τυχαία ή κατανομημένη). Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δύναται να έχει διαφορετικό μήκος κύματος λ_0 , ένταση, φάση, διεύθυνση διάδοσης και πόλωση από την προσπίπτουσα ακτινοβολία.

Η ενέργεια του σκεδασθέντος φωτός προέρχεται από την ενέργεια του αρχικού φωτός το οποίο εξασθενεί. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός

ακολουθεί διαφορετικούς νόμους ανάλογα με τις διαστάσεις των σωματιδίων σε σχέση με το μήκος κύματος. Όταν οι διαστάσεις των σωματιδίων είναι μεγαλύτερες από το μήκος κύματος, η σκεδαζόμενη ένταση είναι σχεδόν ανεξάρτητη από αυτό και συνεπώς, το φως που προκύπτει από την σκέδαση του λευκού φωτός εξακολουθεί να είναι λευκό. Τέτοια περίπτωση έχουμε για παράδειγμα κατά την σκέδαση λευκού φωτός πάνω σε γαλακτώματα ή σε σκόνη κιμωλίας(σκέδαση Tundall)



Είδη σκέδασης

Σκέδαση Rayleigh

Η σκέδαση φωτός Rayleigh παρατηρείται για **σκεδαστές με μέγεθος μικρότερο του μήκους κύματος λ_0** της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σκέδαση Rayleigh έχει ημιαστική φύση, διότι το εκπεμπόμενο φωτόνιο μπορεί να έχει την ίδια ή μικρότερη ενέργεια σε σχέση με το προσπίπτον φωτόνιο. Η ένταση I_R της Rayleigh-σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος της ακτινοβολίας:

$$I_R \propto \frac{1}{\lambda_0^4}$$

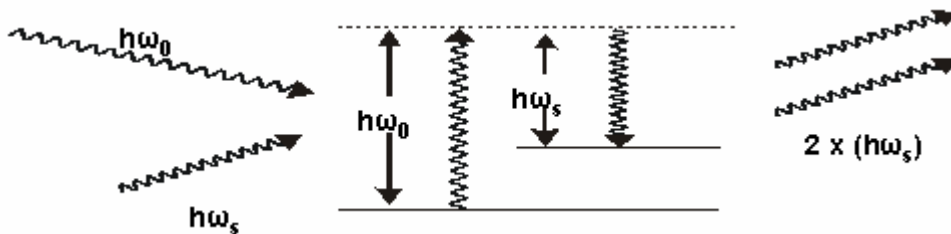
Παραδείγματα φαινομένων σχετιζόμενων με τη σκέδαση Rayleigh:

- Κυανό χρώμα ουρανού, αλλαγή χρωματισμού ουρανού κατά τη δύση και ανατολή του ηλίου. (Οι ιώδεις ακτίνες θα σκεδάζονται πολύ εντονότερα από τις ερυθρές)

- Ο καπνός των τσιγάρων που φαίνεται γαλάζιος από το αναμμένο τσιγάρο ενώ φαίνεται λευκός όταν βγαίνει από το στόμα καθώς η πρόσπτωση του φωτός γίνεται σε εκπεμπόμενα υδρογονοσταγονίδια.
- Απώλειες ενέργειας κατά τη διάδοση ακτινοβολίας σε διάφανα στερεά (οπτικά στοιχεία, κρυστάλλους, οπτικές ίνες).

Σκέδαση Raman

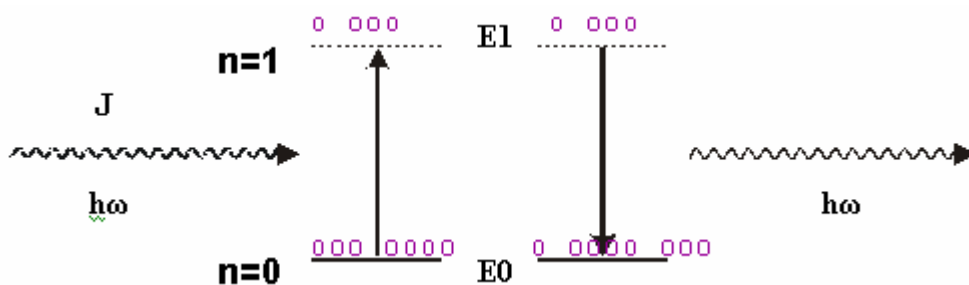
Η σκέδαση Raman παρατηρείται κατά την ταυτόχρονη διέλευση δύο φωτονίων συχνοτήτων ω_0 και ω_s ($\omega_s < \omega_0$) από το οπτικό μέσο, όπου το φωτόνιο ω_0 απορροφάται και ένα μέρος του επανεκπέμπεται με την συχνότητα ω_s , του αρχικού συνοδεύοντος φωτονίου. Η σκέδαση Raman παρατηρείται σε στερεά, υγρά και αέρια μέσα διάδοσης. Η ενέργεια $h(\omega_0 - \omega_s)$ εκπέμπεται ως φωνόνιο.



Είδη Φασματοσκοπίας

Φασματοσκοπία εκπομπής

Η **φασματοσκοπία εκπομπής** (emission spectroscopy) διαφέρει από τους υπόλοιπους τύπους διότι δεν απαιτούνται εξωγενείς πηγές ακτινοβολίας. Το ίδιο το δείγμα είναι ο εκπομπός. Η μετάβαση των ηλεκτρονίων του ατόμου από την αρχική κατάσταση $n=0$ στην διεγερμένη κατάσταση $n=1$, με αλληλεπίδραση θερμικής ακτινοβολίας πυκνότητας ενέργειας J και συχνότητας ω όπου $h\omega = E1 - E0$, ονομάζεται απορρόφηση (absorption). Η μετάπτωση από τη διεγερμένη κατάσταση $n=1$ στην αρχική κατάσταση $n=0$, με την ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου με συχνότητα ω , όπου $h\omega = E1 - E0$, ονομάζεται εκπομπή (emission).



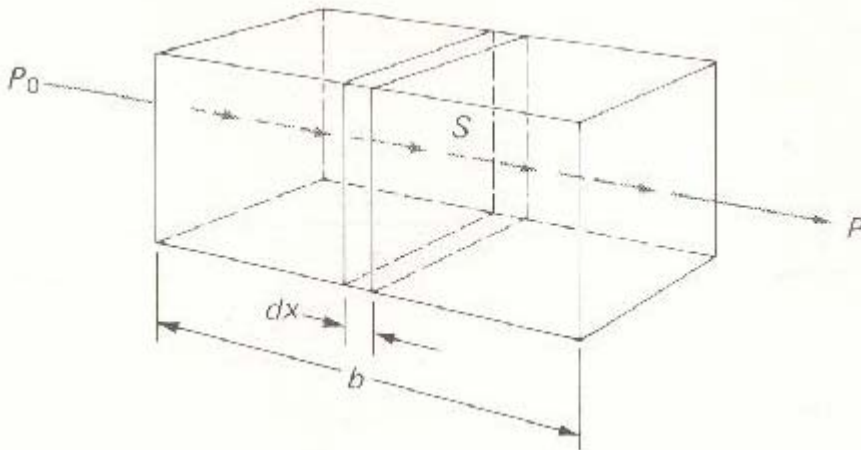
Φασματοσκοπία Απορρόφησης (Absorption Spectroscopy)

Λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φωτονίων και των μορίων απορρόφησης, η δύναμη της δέσμης μειώνεται από P_0 σε P . Η μετάδοση (transmittance) T δίνεται από την παρακάτω σχέση: $T = P / P_0$

- Η μετάδοση εκφράζεται συχνά ως ποσοστό επί της εκατό(σαν καθαρός αριθμός).
- Η απορροφητικότητα καθορίζεται από την εξίσωση:

$$A = -\log(T) = \log(P_0/P)$$

- Σε αντίθεση με την εκπομπή, η απορροφητικότητα αυξάνεται καθώς η εξασθένιση της δέσμης φωτός γίνεται μεγαλύτερη.



Η απορροφητικότητα ενός διαλύματος είναι ανάλογη με το μήκος που διανύει το φως μέσα στο διάλυμα και την συγκέντρωση του διαλύματος σε συστατικά που απορροφούν την ακτινοβολούμενη ενέργεια. Άρα έχουμε:

$$A = abc$$

Όπου το a είναι μια σταθερά που ονομάζεται απορροφητική ικανότητα (absorptivity), b είναι το μήκος και c η συγκέντρωση του διαλύματος.

Η παραπάνω μαθηματική έκφραση αποτελεί τον **νόμο του Beer**. Ας πάρουμε σαν παράδειγμα το παραπάνω σχήμα. Μια δέσμη παράλληλης μονοχρωματικής ακτινοβολίας με ενέργεια P_0 πέφτει πάνω στην επιφάνεια του παραλληλεπίπεδου. Αφού διανύσει μήκος b του υλικού, το οποίο περιέχει n σωματίδια που απορροφούν ακτινοβολία (άτομα, ιόντα, μόρια), η ενέργεια της δέσμης ελατώνεται σε P σαν αποτέλεσμα της απορρόφησης μέρους της ακτινοβολίας. Ας θεωρήσουμε μια διατομή του παραλληλεπίπεδου με εμβαδό S και απειροελάχιστη πυκνότητα dx . Στο εσωτερικό αυτής της επιφάνειας περιέχονται dn σωματίδια που απορροφούν, στα οποία αντιστοιχεί μια περιοχή όπου εγκλωβίζονται φωτόνια. Αυτό σημαίνει ότι μόλις ένα φωτόνιο πλησιάσει μια τέτοια περιοχή, αμέσως θα έχουμε απορρόφηση ακτινοβολίας. Η συνολική προβαλλόμενη περιοχή αυτών των υποπεριοχών που

εγκλωβίζουν φωτόνια ορίζεται ως dS . Η αναλογία αυτής της περιοχής σε σχέση με την συνολική επιφάνεια είναι dS/S .

Η ενέργεια της δέσμης (P_x) που εισέρχεται στο υλικό είναι ανάλογη με τον αριθμό των φωτονίων ανά τετραγωνικό εκατοστό ανά δευτερόλεπτο, και dP_x αναπαριστά την ποσότητα που εξέρχεται ανά δευτερόλεπτο από τη διατομή. Άρα το κλάσμα που απορροφάται είναι dP_x / P_x και ισούται με την μέση πιθανότητα εγκλωβισμού φωτονίων. Συνεπώς:

$$-dP_x / P_x = dS/S$$

Το πρόσρημο υποδηλώνει ότι το P μειώνεται.

Το dS δίνεται από τη σχέση: $dS = an$

Από τις παραπάνω σχέσεις έχουμε, μετά από ολοκλήρωση:

$$-\ln(P/P_0) = an / S$$

η οποία τελικά καταλήγει ύστερα από απλοποιήσεις μονάδων σε

$$A = -\log(P_0/P) \text{ νόμος του BEER.}$$

Ο παραδοσιακός τρόπος για τη μελέτη της φασματοσκοπίας απορρόφησης στην περιοχή της συχνότητας είναι η ομαλή μεταβολή της συχνότητας ή του μήκους κύματος μιας προσπίπτουσας ακτίνας (π.χ. με την περιστροφή ενός πρίσματος), και η καταγραφή των συχνοτήτων που απορροφώνται. Το φως διαδίδεται μέσω ενός δείγματος και το ποσό της απορρόφησης εξαρτάται από το μήκος του δείγματος (l), και τη συγκέντρωση του απορροφητή (c), σύμφωνα με τον τύπο

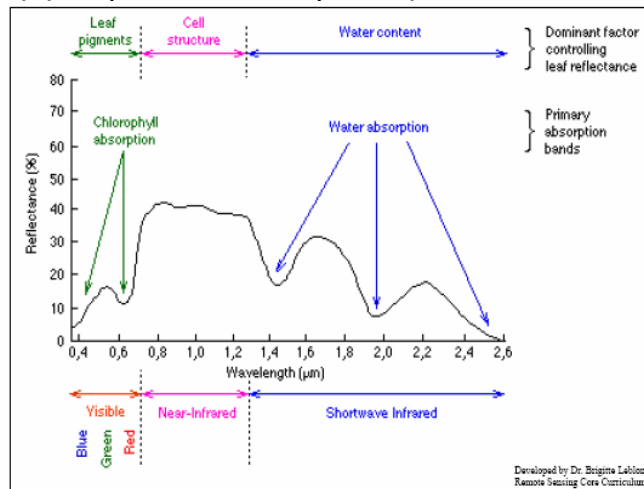
$$I = I_0 \exp(- a / c)$$

όπου I_0 είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτίνας και το I είναι η ένταση της ανακλώμενης ακτίνας. Η προσπίπτουσα ακτίνα συνήθως χωρίζεται στα δύο έτσι ώστε μια ακτίνα μπορεί να θεωρηθεί ως αναφορά, και το I και I_0 να μετριοούνται από κοινού. Η παραπάνω έκφραση καλείται νόμος των **Beer - Lambert**, και το a είναι ο συντελεστής απορρόφησης.

Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με τους φυτικούς ιστούς.

Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα φύλλα φυτών και τα σχετικά στοιχεία είναι το θεμέλιο για την κατανόηση των εφαρμογών της φασματοσκοπίας και της τηλεπισκόπησης στη φυτική ανάλυση. Οι βιολογικές, οι χημικές και φυσικές ιδιότητες της βλάστησης επιδρούν στο συντελεστή ανάκλασης, στη μετάδοση και στην απορροφητικότητα (absorptance) της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, που προέρχεται από διάφορες περιοχές στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Αν και τα συστατικά των φυτών (πχ κλαδιά, άνθη) έχουν μια επίδραση στη φασματική απόκριση, η συμβολή τους είναι μικρή όταν συγκρίνεται με αυτή των φύλλων των φυτών. Το ακόλουθο κείμενο θα εστιάσει στις οπτικές ιδιότητες των

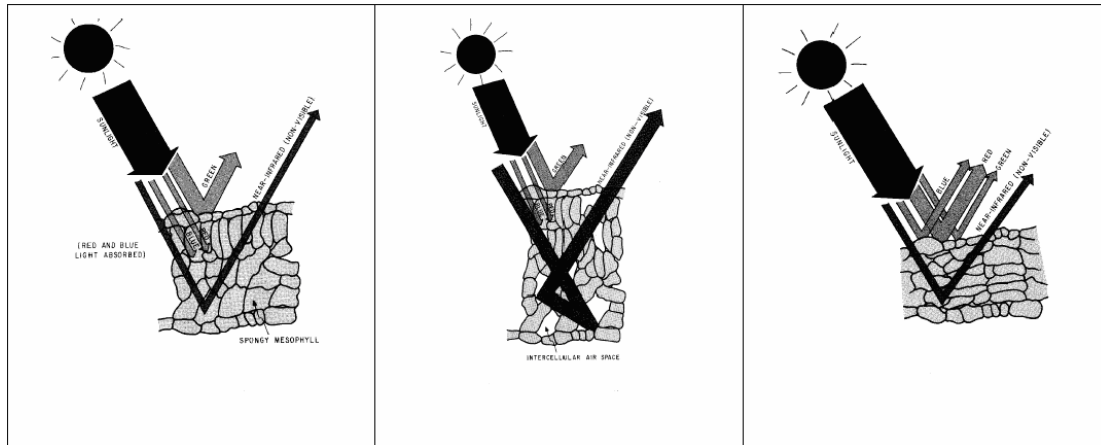
φύλλων φυτών στον ορατό και στο κοντινό υπέρυθρο (400-1350 nm), με μια έμφαση στα δικοτυλκήδονα φυτά.



Το ορατό και το κοντινό υπέρυθρο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματικές ιδιότητες των φύλλων που αφορούν διαφορετικά συστατικά ενός φύλλου: 1) 400-750 nm (χρωμοφόρες φυτών, ειδικά χλωροφύλλες α και β, καροτίνες, και xanthophylls) 2) 750-1350 nm (εσωτερική δομή φύλλων).

Τα περισσότερα φυτά εμφανίζονται πράσινα λόγω της μεγάλης (70-90%) απορρόφησης του φωτός από τη χλωροφύλλη στα 450 nm (μπλε) και 680 nm (κόκκινο) και σχετικά λιγότερη απορρόφηση στα πράσινα μήκη κύματος (550 nm). Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της ανάπτυξης των φυτών, η συγκέντρωση χλωροφύλλης είναι σχετικά χαμηλή έναντι των καρωτενοειδών και η οπτική εμφάνιση ενός φύλλου είναι χλωμή πράσινη. Το μπλε και κόκκινο φως απορροφάται και χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας για τη φωτοσύνθεση και τις φωτοχημικές αντιδράσεις. Δεδομένου ότι οι φυτά ωριμάζουν, η αύξηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης είναι ανάλογη με άλλες χρωμοφόρες, και το φυτό εμφανίζεται από πράσινο έως σκούρο πράσινο. Μέχρι τη γήρανση, η σύνθεση της χλωροφύλλης παύει, με συνέπεια τη λιγότερη απορρόφηση φωτός στα μπλε και κόκκινα μήκη κύματος. Στο γερασμένο φυτό κυριαρχούν άλλες χρωστικές ουσίες (εκτός της χλωροφύλλης), με συνέπεια ένα κίτρινο έως καφετί χρώμα.

Στην επόμενη φασματική κατηγορία (750-1350 nm), ο συντελεστής ανάκλασης επηρεάζεται από την εσωτερική δομή φύλλων. Σε αυτή την φασματική ζώνη εμφανίζεται σχετικά, υψηλότερος συντελεστής ανάκλασης, όταν συγκρίνεται με το ορατό φως, με πάνω από 50% της εισερχόμενης ακτινοβολίας να ανακλάται από τα ώριμα φύλλα. Στα δικοτυλήδονα φυτά, όπως το βαμβάκι, ο συντελεστής ανάκλασης στο υπέρυθρο καθορίζεται από την ανάπτυξη του σπογγώδους mesophyll ιστού παρεγχυμάτων. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων ανάπτυξης των φύλλων, τα mesophyll διάκενα αέρα εμφανίζονται καθώς τα τοιχώματα των κυττάρων απομακρύνονται. Προσπίπτουν υπέρυθρο φως διαπερνά τα ανώτερα στρώματα του φύλλου προς το σπογγώδες mesophyll, ανακλώμενο από το κυτταρικό τοίχωμα στα mesophyll διάκενα αέρα. Όσο τα διάκενα αέρα μεγαλώνουν, με επακόλουθο την αύξηση της επιφάνειας του κυτταρικού τοιχώματος, ο συντελεστής ανάκλασης στο κοντινό υπέρυθρο αυξάνεται. Ο συντελεστής ανάκλασης είναι στο υψηλότερό του σημείο στην πλήρη ωριμότητα και μειώνεται μέχρι την κατάρρευση του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της γήρανσης.



«νεαρό φύλλο»

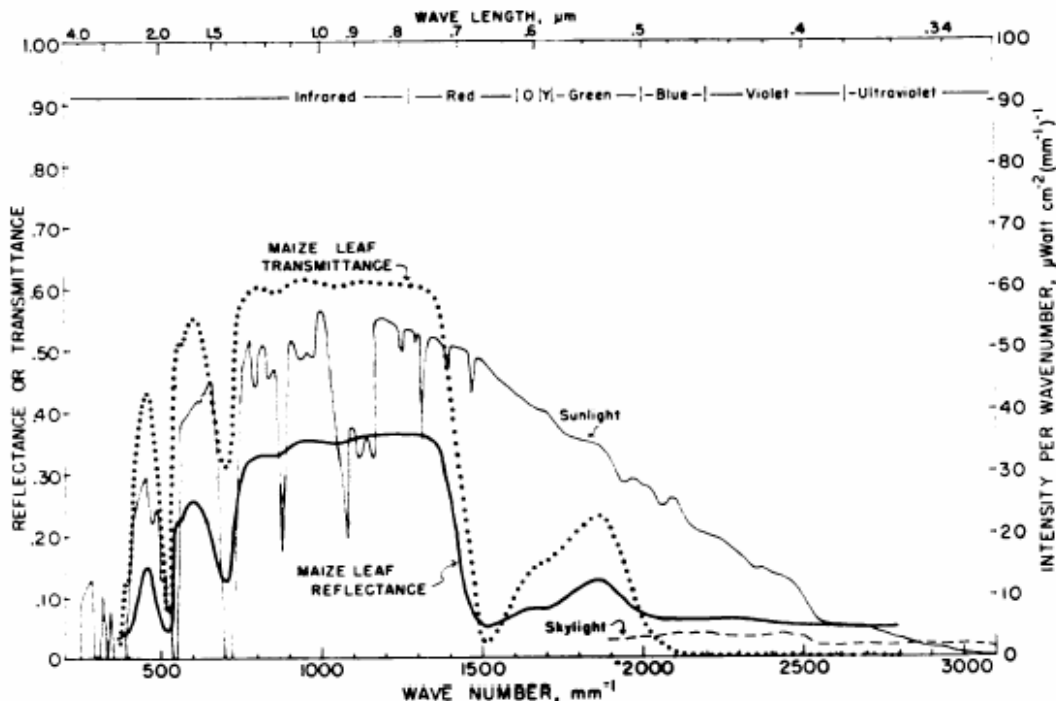
«ώριμο φύλλο»

«γερασμένο φύλλο»

Αλληλεπίδραση του φωτός με τους φυτικούς ιστούς

Ανάκλαση και εκπομπή ακτινοβολίας από τα φύλλα

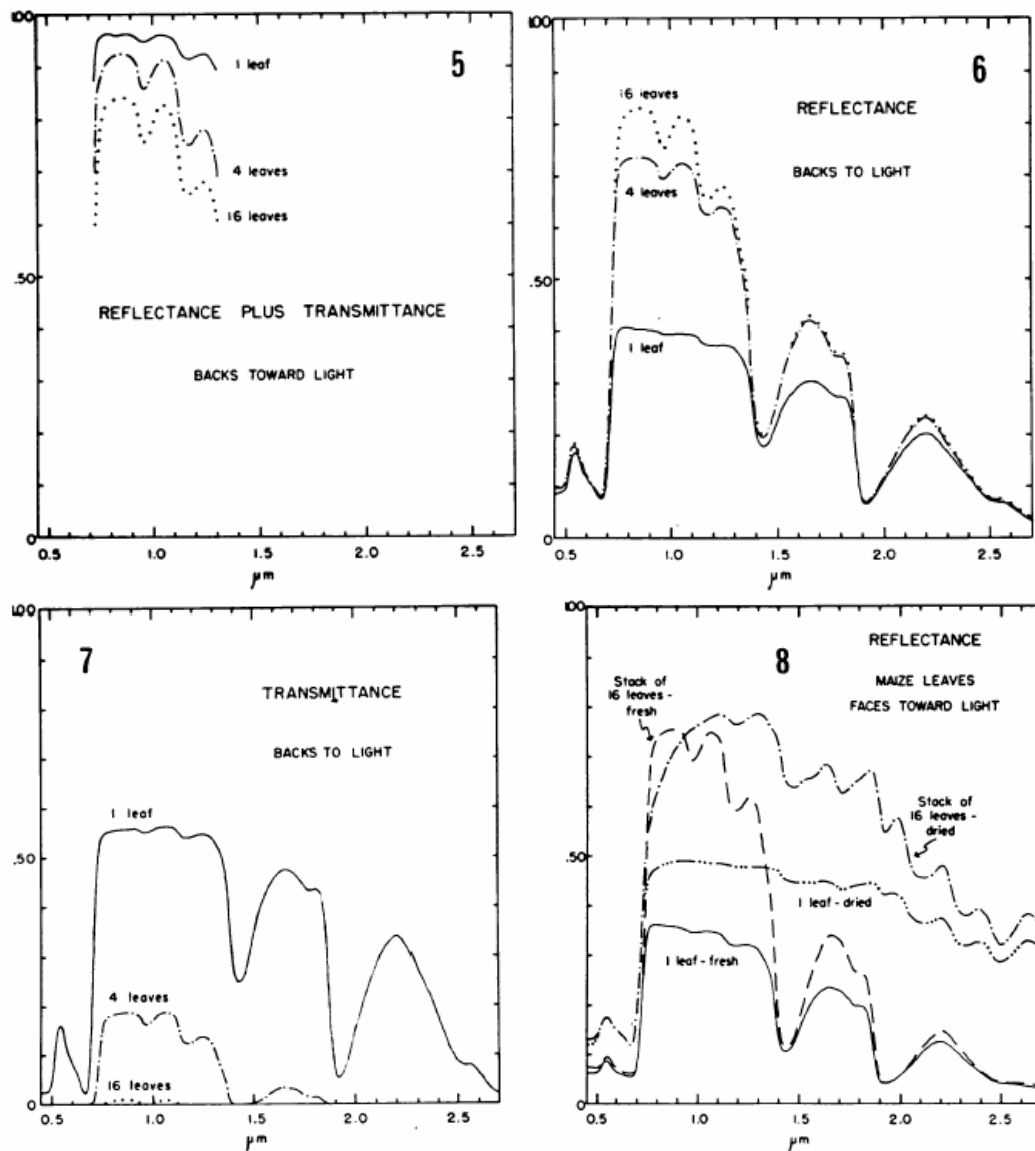
Ο συντελεστής ανάκλασης και οι καμπύλες εκπομπής για ένα χαρακτηριστικό φύλλο αραβόσιτου παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα. Η καμπύλη μετάδοσης παρουσιάζει αιχμηρότερες κορυφές από ότι η καμπύλη ανάκλασης, επειδή ένα ποσό του ανακλώμενου φωτός διαπερνά μόλις και μετά βίας το φύλλο πριν ανακλαστεί και επομένως έχει μικρή πιθανότητα να αλληλεπιδράσει με τα υλικά που απορροφούν στο φύλλο.



Απορρόφηση στο υπέρυθρο

Όταν το φως αλληλεπιδρά με οποιοδήποτε αντικείμενο μπορεί να συμβούν τρεις διαδικασίες ανάκλαση, εκπομπή ή απορρόφηση. Το σχήμα 5 παρουσιάζει ότι το ποσό του συντελεστή ανάκλασης και της μετάδοσης είναι 96% για φύλλα σόγιας μεταξύ 800 και 1100 nm. Επομένως λιγότερο από 4% του φωτός που προσπίπτει στο φύλλο σε αυτήν την ζώνη μήκους κύματος,

απορροφάται. Οι περιορισμοί λόγω των πειραματικών οργάνων, δημιουργούν κάποια αμφιβολία όσον αφορά την ακρίβεια αυτού του αριθμού 4%, αλλά το σχήμα 5 δείχνει πως πράγματι υπάρχει κάποια απορρόφηση του φωτός σε αυτήν την περιοχή, αφού απορροφάται περισσότερο φως όταν συσσωρεύονται τα φύλλα. Ο ώμος της καμπύλης ανάκλασης στα 750 nm είναι μάλλον αιχμηρός για ένα φύλλο στα περισσότερα φυτά αλλά είναι αρκετά στρογγυλεμένος εάν διάφορα φύλλα συσσωρεύονται μαζί (αριθμοί 6 και 8). Η καμπύλη της μετάδοσης δεν έχει τόσο αιχμηρό ώμο σε αυτό μήκος κύματος, αλλά και αυτή, παρουσιάζει στρογγυλοποίηση όταν τα φύλλα είναι συσσωρευμένα (σχέδιο 7), παρουσιάζοντας ελαφρώς μεγαλύτερη απορρόφηση στα 770 nm απ' ότι στα 800 nm. Η απορρόφηση σε αυτήν την μπάντα σίγουρα εμφανίζεται όταν τα φύλλα είναι ξηρά (σχέδιο 8). Το ποσό της απορρόφησης εξαρτάται από τα είδη των φύλλων και τον τρόπο με τον οποίο ξηραίνονται. Η παραγωγή του απορροφώντος υλικού είναι συχνά συνοδευόμενη από μια προφανή αμαύρωση(καταστροφή της χλωροφύλλης), αλλά σε μερικούς τύπους φύλλων η αυξανόμενη απορρόφηση στα 800 nm δεν συνοδεύεται από οποιεσδήποτε ορατές αλλαγές.



Βιβλιογραφία

1. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, Principles of Instrumental Analysis, ISBN : 0-030-02078-6 (1997) Publisher: Brooks Cole
2. Στέλιος Π. Μερτίκας, Τηλεπισκόπηση και ψηφιακή ανάλυση εικόνας, ISBN:960-405-949-1 (1999), εκδόσεις ΙΩΝ.
3. Gates, D. M., Physical and physiological properties of plants. *Remote Sensing with Special Reference to Agriculture and Forestry. National Academy of Sciences, Washington, D. C. pp. 224-252, (1970)*
4. Michele R. Slaton, E. Raymond Hunt, Jr., William K. Smith, Estimating near-infrared leaf reflectance, from leaf structural characteristics, *American Journal of Botany 88(2): 278-284, 2001.*
5. Scott A. Samson, Optical properties of vegetation in the visible, near and shortwave infrared wavelengths, *Mississippi State University*
6. K.Maxwell, G. Johnson, Chlorophyll fluorescence - a practical guide, *Journal of experimental botany, vol. 51, no. 345, April 2000*
7. Kevin Oxborough, Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance, *Journal of Experimental Botany, Vol. 55, No. 400, May 2004*
8. R. Berg, Evaluation of spectral imaging for plant cell analysis, *Journal of microscopy, Vol. 214, May 2004*
9. Timo Zimmermann, Jens Rietdorf, Rainer Pepperkok, Spectral imaging and its applications in live cell microscopy, *FEBS Letters 546 (2003) 87-92*

Κεφάλαιο 3^ο

Επεμβατικές και μη επεμβατικές μέθοδοι για την εκτίμηση του περιεχομένου σε χλωροφύλλη των φυτικών ιστών.

Επεμβατικές μέθοδοι

Υπάρχουν πάρα πολλές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στους φυτικούς ιστούς, όπως π.χ. ο διαχωρισμός με χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography). Παρακάτω θα περιγράψουμε μια βιοχημική καταστρεπτική μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης.

1. Ζυγίζονται 4 γραμμάρια φρέσκα πράσινα φύλλα από το υπό εξέταση φυτό. Τα φύλλα κόβονται σε μικρά τεμάχια και εμποτίζονται με 20ml ακετόνης σε ένα γουδί όπου και λιανίζονται. Το υγρό μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο και το φυτικό υλικό επανεκχυλίζεται ως ότου το πράσινο χρώμα τους να εξαφανιστεί. Στο σύνολο του εκχυλίσματος προστίθενται 5-10 γραμ. ανθρακικό ασβέστιο και 2-3 γραμ. ξηρού θειικού μαγνησίου για να αποφευχθεί η αποδόμηση της φαιοφυτίνης και το μίγμα φιλτράρεται σε μια χοάνη Buchner. Τα υπολείμματα ξεπλένονται με μικρούς όγκους νέας ακετόνης ώστε να δώσουν ένα διάλυμα χλωροφύλλης γνωστού όγκου. όγκος 10 ml δείγματος είναι αρκετός για τον φασματοφωτομετρικό χαρακτηρισμό.

2. Η οπτική απορρόφηση του δείγματος μετράται στα 646 και 663 nm.

3. Οι μοριακές συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης α και β στο εκχύλισμα μπορούν να υπολογιστούν σύμφωνα με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο.

$$\text{Chlorophyll a (mg/l)} = 12,21A_{663} - 2,81A_{646}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/l)} = 20,13A_{646} - 5,03A_{663}$$

A_{646} : απορροφητικότητα στα 646 nm

A_{663} : απορροφητικότητα στα 663 nm

Το μοριακό βάρος της χλωροφύλλης α είναι 893,5 και της β είναι 907,5

Ανάλυση TLC

4. Το μίγμα εξατμίζεται μέχρι να είναι τελείως στεγνό. Ύστερα το μίγμα ξαναδιαλύεται σε 1 ml ακετόνης.

5. 0,5 ml του εκχυλίσματος της χλωροφύλλης τοποθετείται σε σχήμα λωρίδας, και σε απόσταση 2,5 cm από την άκρη ενός TLC πιάτου με κυτταρίνη. Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται τέσσερις φορές στεγνώνοντας πριν από κάθε εφαρμογή.

6. Το πιάτο εμβαπτίζεται σε πετρέλαιο(b.p. 40° – 60°), ακετόνη, η-προπανόλη(90:10:0,45) μέσα σε ένα δοχείο χρωματογραφίας, έως ότου η στάθμη του διαλυτικού μέσου να είναι 2,5 cm από την επιφάνεια(χρόνος αναμονής περίπου 1 h).

7. Το πιάτο στεγνώνεται και στη συνέχεια εξετάζεται με υπεριώδη ακτινοβολία(365 nm). Σημειώνονται οι 6 κύριες μπάντες, τέσσερις για τα καρτενοειδή και δύο για την χλωροφύλλη, διακρίνοντας τα διαφορετικά χρώματα που έχουν στο ορατό φάσμα.

8. Σβήνονται οι μπάντες της χλωροφύλλης, και η πιο ευδιάκριτη κίτρινη μπάντα την διαχωρίζεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα. Η σκόνη εκχυλίζεται με 5 ml ακετόνης και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για να κατακάσει η σκόνη.

9. Μετράται το φάσμα απορρόφησης του κίτρινου δείγματος μεταξύ 400-500 nm και των δύο πράσινων δειγμάτων μεταξύ 350-700 nm.

10. Υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α,β στο φυτό(nmol/gr).

Από την παραπάνω διαδικασία προκύπτουν αρκετά συμπεράσματα όσον αφορά την ακρίβεια, την χρησιμότητα, τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματα της παραπάνω μεθόδου. Κατά πρώτο λόγο η παραπάνω μέθοδος είναι απόλυτα ακριβής στην μέτρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης αλλά αυτή η τιμή της συγκέντρωσης είναι μια μέση τιμή και όχι η συγκέντρωση σε κάθε σημείο του φύλλου, άλλωστε οι χρωμοφόρες, συμπεριλαμβανομένου και της χλωροφύλλης, δεν έχουν ομοιόμορφη κατανομή στα φύλλα του φυτού. Δεύτερον η μέθοδος αυτή χρειάζεται 3-4 gr φυτικού ιστού, μια αρκετά μεγάλη ποσότητα, που πολλές φορές δεν είναι δυνατόν να την έχουμε για να κάνουμε την μέτρηση. Τρίτον αφού μέρος του φυτού καταστρέφεται δεν είναι δυνατόν να παρακολουθήσουμε την εξέλιξη του φυτού και έτσι δεν μπορούμε να το χρησιμοποιήσουμε για μελλοντική μέτρηση. Τέλος όσον αφορά την χρησιμότητα της μέτρησης ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η μέτρηση αυτή απαιτεί περίπου 2 ώρες και παράλληλα απαιτεί αρκετά μεγάλο εργαστηριακό εξοπλισμό.

Μη επεμβατικές μέθοδοι

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν αρκετές μη καταστρεπτικές-επεμβατικές μέθοδοι για την ανίχνευση του περιεχομένου των φύλλων σε χλωροφύλλη, π.χ. η φασματομετρία(spectrometry). Στη συνέχεια θα αναλύσουμε την έννοια της φασματομετρίας τόσο με επίγεια όσο και με υπέργεια αλλά και την έννοια της υπερφασματικής απεικόνισης(hyperspectral imaging).

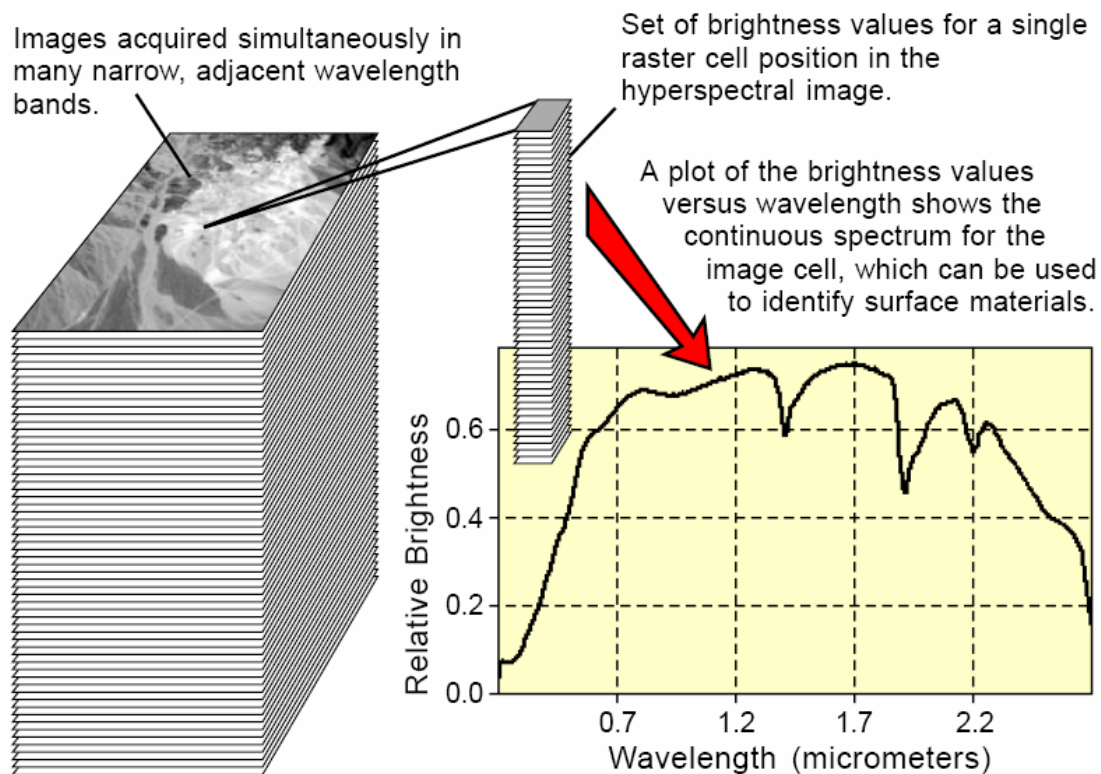
Hyperspectral imaging

Ο τομέας της τηλεπισκόπησης έχει γνωρίσει τεράστια ανάπτυξη στις προηγούμενες δεκαετίες. Ίσως κανένας τομέας της τηλεπισκόπησης δεν είχε τόσο πολλές εφαρμογές στις περιβαλλοντικές μελέτες όπως η φασματομετρία απεικόνισης. Η φασματομετρία απεικόνισης αναφέρεται στην απεικόνιση μιας σκηνής μέσα από έναν μεγάλο αριθμό διακριτών και παρακείμενων φασματικών ζωνών έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα πλήρες φάσμα συντελεστή ανάκλασης για την περιοχή που θέλουμε να απεικονίσουμε. Αυτός ο τύπος απεικόνισης είναι επίσης γνωστός ως hyperspectral απεικόνιση.

Τα φάσματα ανάκλασης των περισσότερων υλικών στη γήινη επιφάνεια περιέχουν τα χαρακτηριστικά ή τα διαγνωστικά γνωρίσματα της απορρόφησης. Οι μακρινοί αισθητήρες οι οποίοι είναι ικανοί να σχηματίζουν τα πλήρη φάσματα ανάκλασης από μεγάλες περιοχές, προσφέρουν ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της γης και του περιβάλλοντος. Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα απορρόφησης του φάσματος ανάκλασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τη διαμόρφωση ορυκτών σε βράχους, και έχουν χρησιμοποιηθεί από τους γεωλόγους για γεωλογικές χαρτογραφήσεις και μελέτες των ηφαιστειών. Οι τεχνικές φασματικής ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις μελέτες της βλάστησης, όπως ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων της εδαφολογικής σύνθεσης στα δέντρα με την αξιολόγηση της φασματικής μετατόπισης της ζώνης απορρόφησης της χλωροφύλλης, η περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε νερό, η αξιολόγηση της δασικής καταστροφής ύστερα από πυρκαγιά κτλ. Τέτοια παραδείγματα είναι μόνο ένα μικρό δείγμα των πολλών εφαρμογών της φασματομετρίας απεικόνισης.

Οι πολυφασματικοί(*multispectral*)μακρινοί αισθητήρες όπως το Landsat Thematic mapper και το SPOT XS παράγουν εικόνες με μερικές σχετικά ευρείες ζώνες μήκους κύματος. Οι hyperspectral αισθητήρες, συλλέγουν ταυτόχρονα στοιχεία εικόνας σε δωδεκάδες ή σε εκατοντάδες στενές, παρακείμενες φασματικές ζώνες. Από αυτές τις μετρήσεις παράγεται ένα συνεχές φάσμα για κάθε κύτταρο εικόνας, όπως φαίνεται στην απεικόνιση κατωτέρω. Μετά από τις ρυθμίσεις για τον αισθητήρα, τα φάσματα εικόνας μπορούν να συγκριθούν με τα επίγεια ή τα εργαστηριακά φάσματα συντελεστή ανάκλασης, προκειμένου να αναγνωριστούν και να χαρτογραφηθούν οι ιδιαίτεροι τύποι βλάστησης. Οι εικόνες hyperspectral περιέχουν έναν πλούτο των στοιχείων, αλλά η ερμηνεία τους απαιτεί την κατανόηση ακριβώς ποιών ιδιοτήτων των επίγειων υλικών προσπαθούμε να

μετρήσουμε, και πώς συσχετίζονται με τις μετρήσεις από τον hyperspectral αισθητήρα.



Το φασματόμετρο απεικόνισης

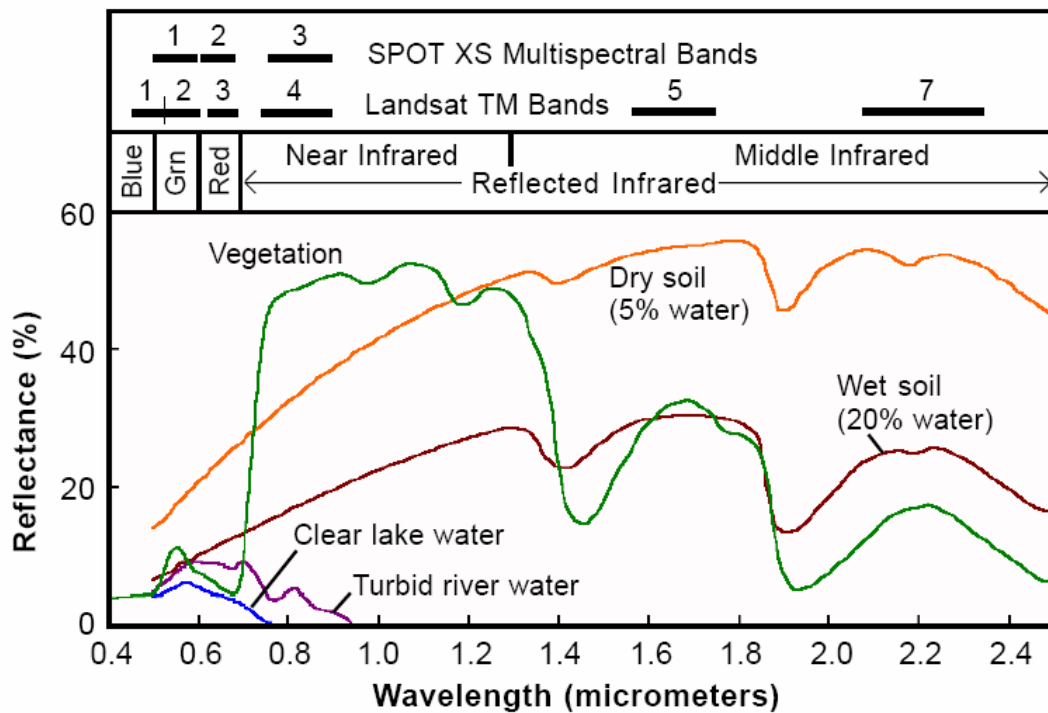
Οι εικόνες hyperspectral παράγονται από τα φασματόμετρα απεικόνισης. Η ανάπτυξη αυτών των σύνθετων αισθητήρων έχει περιλάβει τη σύγκλιση δύο σχετικών αλλά διαφορετικών τεχνολογιών: της φασματοσκοπίας και της τηλεπισκόπησης. Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη του φωτός που εκπέμπεται ή ανακλάται από τα υλικά. Όπως εφαρμόζεται στον τομέα της τηλεπισκόπησης, η φασματοσκοπία εξετάζει το φάσμα του φωτός του ήλιου που είναι σκεδασμένο από τα υλικά στη γήινη επιφάνεια. Τα φασματόμετρα (ή σπεκτροραδιόμετρα) χρησιμοποιούνται για επίγειες ή εργαστηριακές μετρήσεις του φωτός που ανακλάται από ένα υλικό δοκιμής.

Τα remote imagers σχεδιάζονται για να εστιάσουν και να μετρήσουν το φως που απεικονίζεται από πολλές παρακείμενες περιοχές στη γήινη επιφάνεια. Σε πολλά ψηφιακά imagers, διαδοχικές μετρήσεις μικρών περιοχών γίνονται βάση ενός γεωμετρικού σχεδίου όσο ο αισθητήρας κινείται και απαιτείται διαδοχική επεξεργασία για να συγκεντρωθούν οι μετρήσεις σε εικόνα.

Φασματική ανάκλαση

Στην φασματοσκοπία η θεμελιώδης ιδιότητα που θέλουμε να μετρήσουμε είναι η φασματική ανάκλαση, δηλαδή η αναλογία της ανακλώμενης ακτινοβολίας προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία σαν συνάρτηση του μήκους κύματος. Ο

συντελεστής ανάκλασης ποικίλλει ανάλογα το μήκος κύματος για τα περισσότερα υλικά επειδή η ενέργεια σε ορισμένα μήκη κύματος σκεδάζεται ή απορροφάται σε διαφορετικούς βαθμούς. Αυτές οι διαφορές στον συντελεστή ανάκλασης είναι εμφανείς όταν συγκρίνουμε τις καμπύλες φασματικής ανάκλασης (διαγράμματα του συντελεστή ανάκλασης συναρτήσει του μήκους κύματος) για διαφορετικά υλικά, όπως στην απεικόνιση κατωτέρω. Οι έντονες προς τα κάτω εκτροπές των φασματικών καμπύλων χαρακτηρίζουν ζώνες μήκους κύματος για τις οποίες το υλικό απορροφά επιλεκτικά την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Αυτά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα καλούνται συνήθως ζώνες απορρόφησης. Η γενική μορφή μιας φασματικής καμπύλης και η θέση των ζωνών απορρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν και να κάνουν διακρίσεις σε διαφορετικά υλικά. Για παράδειγμα, η βλάστηση έχει τον υψηλότερο συντελεστή ανάκλασης στην κοντινή υπέρυθη ζώνη και χαμηλότερο συντελεστή ανάκλασης του κόκκινου φωτός από το χρώμα.



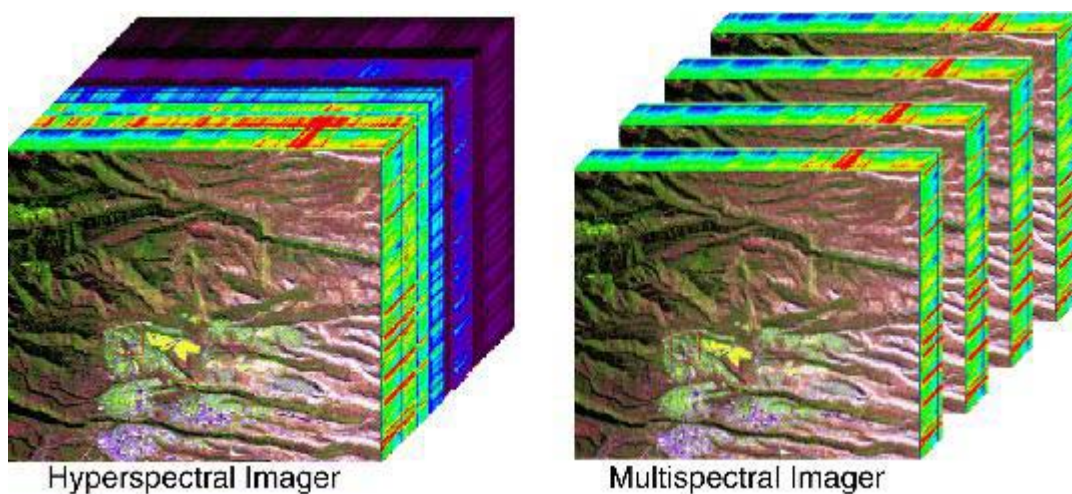
Για να υπολογιστεί ο συντελεστής ανάκλασης ενός υλικού, όταν γίνονται φασματικές μετρήσεις στην ύπαιθρο ή στο εργαστήριο, απαιτούνται οι τιμές της προσπίπτουσας ενέργειας. Αυτές οι τιμές είναι είτε μετρημένες άμεσα είτε προέρχονται από τις μετρήσεις του ανακλώμενου φωτός (κάτω από τους ίδιους όρους φωτισμού με το υλικό δοκιμής) από ένα τυποποιημένο υλικό αναφοράς με γνωστή φασματική ανάκλαση.

Hyperspectral imaging vs. multispectral imaging

Στη φασματική απεικόνιση, η ένταση του φωτός καταγράφεται ως συνάρτηση και του μήκους κύματος και της θέσης. Στην περιοχή της εικόνας, το σύνολο δεδομένων περιλαμβάνει μια πλήρη εικόνα σε κάθε μεμονωμένο μήκος

κύματος. Στην περιοχή της φασματοσκοπίας, ένα πλήρως αναλυμένο φάσμα μπορεί να καταγραφεί σε κάθε μεμονωμένο pixel.

Υπερφασματικοί απεικονιστές σχεδιάστηκαν για να ενεργήσουν ως επίγεια φασματόμετρα. Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των παραδοσιακών και των υπερφασματικών απεικονιστών αφορά τις τεχνικές δειγματοληψίας. Ενώ τα δείγματα ενός πολυφασματικού ανιχνευτή είναι μεγάλα και χωρισμένα σε ζώνες του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, ο υπερφασματικός απεικονιστής παίρνει μικρά, συνεχή δείγματα, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Επειδή οι υπερφασματικοί απεικονιστές δειγματοληπτούν ολόκληρο το ορατό και το υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι καμπύλες ανάκλασης που παράγουν, μοιάζουν με εκείνες που μέτριοι στα εργαστηριακά πειράματα.



Υπάρχουν διάφορες μεθοδολογίες για τη λήψη των φασματικών δεδομένων, και η βασική διαφορά τους είναι η επιλογή του μήκους κύματος ή της ζώνης των μηκών κύματος που επιλέγονται για τη λήψη των εικόνων.

Στην περίπτωση της πολυφασματικής απεικόνισης επιλέγουμε συγκεκριμένα μήκη κύματος στα οποία θα σαρώσουμε το αντικείμενο της μελέτης, τα οποία μάλιστα έχουν και κάποια απόσταση μεταξύ τους. Στην περίπτωση της υπερφασματικής απεικόνισης έχουμε ένα κάτω και ένα άνω όριο στο φάσμα και λαμβάνουμε διαρκώς εικόνες με βήματα της τάξης των 1-10 nm. Επιτυγχάνουμε έτσι τη λήψη δεδομένων σε πιο στενά φασματικά όρια.

Επίγεια και υπέργεια μέσα επισκόπησης

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, την μέθοδο του spectral-imaging μπορούμε να την εφαρμόσουμε τόσο με επίγεια μέσα, όσο και με υπέργεια, όπως αεροπλάνα και δορυφόρους.

Τα υπέργεια μέσα και συγκεκριμένα οι δορυφόροι υστερούν σε σχέση με τα επίγεια καθώς παρέχουν περιορισμένη χωρική ανάλυση (30 μέτρα χωρική ανάλυση), ενώ η ακρίβεια των αισθητήρων τους εξαρτάται και από την τροχιά

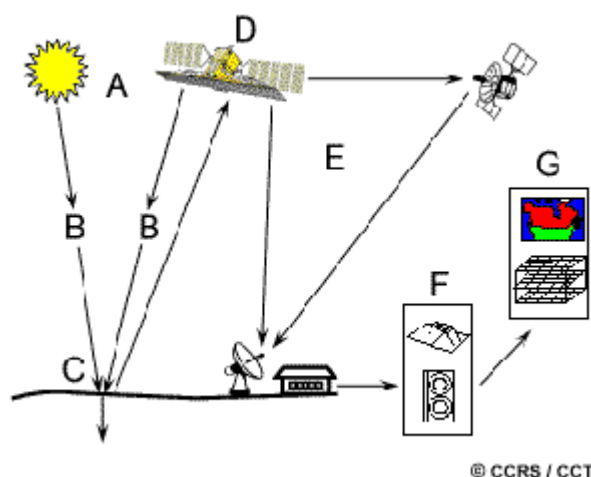
που διαγράφει ο δορυφόρος και τη θέση του σε σχέση με το σημείο παρατήρησης. Για το λόγο αυτό οι δορυφόροι δεν προτιμώνται στην μελέτη της φυτοπαθολογίας, παρά περισσότερο σε ευρύτερης κλίμακας περιπτώσεις (υδάτωση μεγάλων περιοχών, ποσοστό δενδροκάλυψης κ.λπ.).

Με τα επίγεια μέσα επιτυγχάνουμε πολύ καλύτερες αναλύσεις και τη δυνατότητα της επί τόπου επισκόπησης. Τεχνικές που βασίζονται σε λήψη εικόνων από αεροπλάνο προσφέρουν πολύ καλά αποτελέσματα. Βέβαια μπορούμε να συνδυάσουμε και τους επίγειους τρόπους και τους υπέργειους, ώστε να βελτιστοποιήσουμε τα δεδομένα που λαμβάνουμε.

Τηλεπισκόπηση(Remote Sensing)

Η τηλεπισκόπηση είναι η επιστήμη κατά την οποία συγκεντρώνουμε πληροφορίες για τη γήινη επιφάνεια χωρίς να είμαστε σε επαφή με αυτήν πραγματικά. Αυτό γίνεται με την κατανόηση και την καταγραφή της ανακλώμενης ή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και της επεξεργασίας, ανάλυσης και εφαρμογής αυτής της πληροφορίας. Σε ένα μεγάλο μέρος της τηλεπισκόπησης, η διαδικασία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και των υπό εξέταση στόχων. Αυτό εξηγείται με την χρήση των συστημάτων απεικόνισης όπου τα ακόλουθα επτά στοιχεία περιλαμβάνονται. Εντούτοις η τηλεπισκόπηση περιλαμβάνει επίσης την κατανόηση της εκπεμπόμενης ενέργειας και τη χρήση μη απεικονιστικών (non-imaging) αισθητήρων.

- 1. Πηγή ενέργειας ή φωτισμός (A)** - η πρώτη απαίτηση για την τηλεπισκόπηση είναι να υπάρξει μια πηγή ενέργειας που φωτίζει ή παρέχει την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια στον ενδιαφερόμενο στόχο.
- 2. Ακτινοβολία και η ατμόσφαιρα (B)** – όπως η ενέργεια ταξιδεύει από την πηγή στο στόχο, θα έρθει σε επαφή και θα αλληλεπιδράσει με την ατμόσφαιρα. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και δεύτερη φορά καθώς η ενέργεια ταξιδεύει από το στόχο στον αισθητήρα.
- 3. Αλληλεπίδραση με το στόχο (C)** - μόλις η ενέργεια βρει τον δρόμο της προς το στόχο μέσω της ατμόσφαιρας, αλληλεπιδρά με το στόχο ανάλογα με τις ιδιότητες και του στόχου και της ακτινοβολίας.



© CCRS / CCT

- 4. Καταγραφή της ενέργειας από τον αισθητήρα (D)** – αφού η ενέργεια έχει σκεδαστεί, ή εκπεμφθεί από το στόχο, χρειαζόμαστε έναν αισθητήρα (μακρινό - όχι σε επαφή με το στόχο) για να συλλέξουμε και να καταγράψουμε την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.
- 5. Μετάδοση, Υποδοχή, και επεξεργασία (E)** - η ενέργεια που καταγράφεται από τον αισθητήρα πρέπει να διαβιβαστεί, συχνά με ηλεκτρονική μορφή, σε έναν

σταθμό λήψης και επεξεργασίας, όπου τα στοιχεία υποβάλλονται σε επεξεργασία σε μια εικόνα.

6. Ερμηνεία και ανάλυση (F) - η επεξεργασμένη εικόνα ερμηνεύεται, οπτικά και/ή ψηφιακά ή ηλεκτρονικά, για να εξαγάγει τις πληροφορίες για το στόχο που ήταν φωτισμένος.

7. Εφαρμογή (G) - το τελικό στοιχείο της διαδικασίας τηλεπισκόπησης επιτυγχάνεται όταν εφαρμόζουμε τις πληροφορίες που ήμαστε σε θέση να εξαγάγουμε από την εικόνα, προκειμένου να τις καταλάβουμε καλύτερα, να αποκαλύψουμε κάποιες νέες πληροφορίες, ή να βοηθήσουν στην επίλυση ενός ιδιαίτερου προβλήματος.

Πλατφόρμες έδρασης των αισθητήρων

Προκειμένου ένας αισθητήρας να συλλέγει και να καταγράφει την ενέργεια που ανακλάται ή που εκπέμπεται από έναν στόχο ή μια επιφάνεια, πρέπει να εδράζεται σε μια σταθερή πλατφόρμα που αφαιρείται από το στόχο ή την επιφάνεια που παρατηρείται. Οι πλατφόρμες για τους μακρινούς αισθητήρες μπορούν να τοποθετηθούν στο έδαφος, σε αεροσκάφη ή ένα μπαλόνι (ή κάποια άλλη πλατφόρμα μέσα στη γήινη ατμόσφαιρα), ή σε ένα διαστημικό σκάφος ή έναν δορυφόρο έξω από τη γήινη ατμόσφαιρα.

Οι επίγειοι αισθητήρες χρησιμοποιούνται συχνά για να καταγράψουν τις αναλυτικές πληροφορίες για την επιφάνεια που συγκρίνεται με τις πληροφορίες που συλλέγονται από τα αεροσκάφη ή τους δορυφορικούς αισθητήρες. Σε μερικές περιπτώσεις, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει καλύτερα το στόχο που απεικονίζεται από άλλους αισθητήρες. Οι αισθητήρες μπορούν να τοποθετηθούν σε μια σκάλα, σε ψηλά κτήρια κ.λπ.. Τα αεροσκάφη χρησιμοποιούνται συχνά για να συλλέξουν πολύ λεπτομερείς εικόνες και να διευκολύνουν τη συλλογή των στοιχείων πέρα από ουσιαστικά οποιαδήποτε μερίδα της γήινης επιφάνειας οποιαδήποτε στιγμή.

Στο διάστημα, η τηλεπισκόπηση διεξάγεται μερικές φορές από διαστημόπλοια ή συχνότερα από δορυφόρους.. Λόγω των τροχιών τους, οι δορυφόροι επιτρέπουν την επαναλαμβανόμενη κάλυψη της γήινης επιφάνειας σε συνεχή βάση. Το κόστος είναι συχνά ένας σημαντικός παράγοντας στην επιλογή μεταξύ των διάφορων επιλογών πλατφορμών.

Οι τρόποι τηλεπισκόπησης συνοψίζονται παρακάτω:

- **Αεροφωτογραφία**
- **Μεμονωμένοι αισθητήρες**
 1. *Differential Optical Absorption Spectroscopy*
 2. *Θερμοκάμερες*
- **Δορυφόροι**

Τα όργανα μέτρησης της H/M ακτινοβολίας ονομάζονται γενικά ραδιόμετρα και οι βασικές τους κατηγορίες είναι:

- **Αισθητήρες εικόνας (imagers)**
- **Αισθητήρες μέτρησης ,**

Οι αισθητήρες εικόνες επιτρέπουν παρατηρήσεις σε 24ωρη βάση και χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

- **Ορατής ακτινοβολίας (μετρούν την ανακλώμενη ορατή ακτινοβολία)**
- **Υπέυρυθρης ακτινοβολίας (μετρούν την εκπεμπόμενη θερμική ακτινοβολία).**

Αεροφωτογραφία

Η καταγραφή που κάνουν τα φωτογραφικά συστήματα περιορίζεται σε ορισμένη φασματική ζώνη, επειδή κάτω από $\lambda = 0,4 \mu\text{m}$ το ηλιακό φως απορροφάται από το όζον, ενώ για ακτινοβολίες με μήκος κύματος μεγαλύτερο από $\lambda = 0,9 \mu\text{m}$ τα φωτογραφικά γαλακτώματα δεν είναι ευαίσθητα. Το τελικό προϊόν όλων αυτών των φωτογραφικών συστημάτων είναι συνήθως η εικόνα.

Ο όρος εικόνα αναφέρεται σε μια δυσδιάστατη συνάρτηση της φωτεινής έντασης της ακτινοβολίας. Συμβολίζεται με $f(x,y)$ και οι τιμές της συνάρτησης / αντιστοιχούν στην ένταση της ακτινοβολίας του στόχου στο συγκεκριμένο σημείο (x,y) . Δηλαδή, μια εικόνα είναι η γενική μορφή της φωτογραφίας, ανεξάρτητα από το μήκος κύματος ή τη μηχανή που την παράγει. Έτσι, φωτογραφία είναι μια εικόνα που σχηματίζεται από την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς αυτή επιδρά στα φωτοευαίσθητα χημικά του φιλμ.



Οι αεροφωτογραφίες καταγράφουν το φως που ανακλάται από μια επιφάνεια και που η ένταση του καθορίζεται από την ιδιότητα του albedo. Το albedo αντιστοιχεί στην ανακλώμενη από μια επιφάνεια ακτινοβολία και είναι ο λόγος της ανακλώμενης προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία:

Albedo = ανακλώμενη ενέργεια/προσπίπτουσα ενέργεια

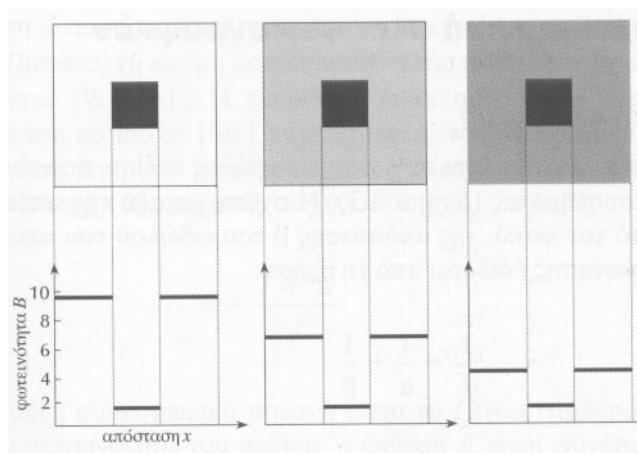
Φωτεινότητα είναι το μέτρο της ποσοστιαίας απόκρισης που δημιουργείται στον οφθαλμό από το φως. Μεταβολές στη φωτεινότητα μπορούν να μετρηθούν σε μια κλίμακα του γκρι από το μαύρο (0%) μέχρι το άσπρο

(100%). Φωτισμός είναι το μέτρο της έντασης του φωτός που προέρχεται από μια πηγή που μετρείται με φωτόμετρα.

Αντίθεση της εικόνας είναι ο λόγος της φωτεινότητας της πιο φωτεινής προς την πιο σκοτεινή περιοχή της εικόνας (Σχήμα 3.2). Δηλαδή, ως αντίθεση C_r μπορεί να οριστεί ο λόγος:

$$C_r = B_{\max} / B_{\min}$$

όπου το B συμβολίζει τη φωτεινότητα. Ο συντελεστής O , είναι σημαντικός παράγοντας στον καθορισμό της ικανότητας διαχωρισμού και αναγνώρισης αντικειμένων σε εικόνες.



Σε εικόνες όπου η αντίθεση εμφανίζεται να είναι μικρή, αυτό συμβαίνει επειδή είτε το πεδίο που φωτογραφίζεται παρουσιάζει από μόνο του μικρή αντίθεση, είτε υπάρχει μεγάλη σκέδαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας λόγω της ατμόσφαιρας είτε, τέλος, το σύστημα Τηλεπισκόπησης μπορεί να στερείται ευαισθησίας.

Η διαχωριστική ικανότητα ή χωρική ανάλυση (resolution) αντιστοιχεί στην ελάχιστη απόσταση μεταξύ αντικειμένων στο έδαφος τα οποία είναι δυνατό να απεικονιστούν στην εικόνα. Η διαχωριστική ισχύς αντιστοιχεί στο σύστημα απεικόνισης, ενώ η διαχωριστική ικανότητα στην εικόνα (φωτογραφία) που παράγεται από το σύστημα. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι, πρώτον, η θεωρητική διαχωριστική ισχύς ενός συστήματος σπανίως επιτυγχάνεται στην πράξη· δεύτερον, η διαχωριστική ικανότητα της εικόνας δεν περιγράφει πλήρως την καταλληλότητα μιας εικόνας σε συγκεκριμένη εφαρμογή¹ και, τρίτον, η διαχωριστική ικανότητα της εικόνας σχετίζεται με διαχωρισμό αντικειμένων, και όχι με το μέγεθος του μικρότερου αντικειμένου που μπορούμε να παρατηρήσουμε.

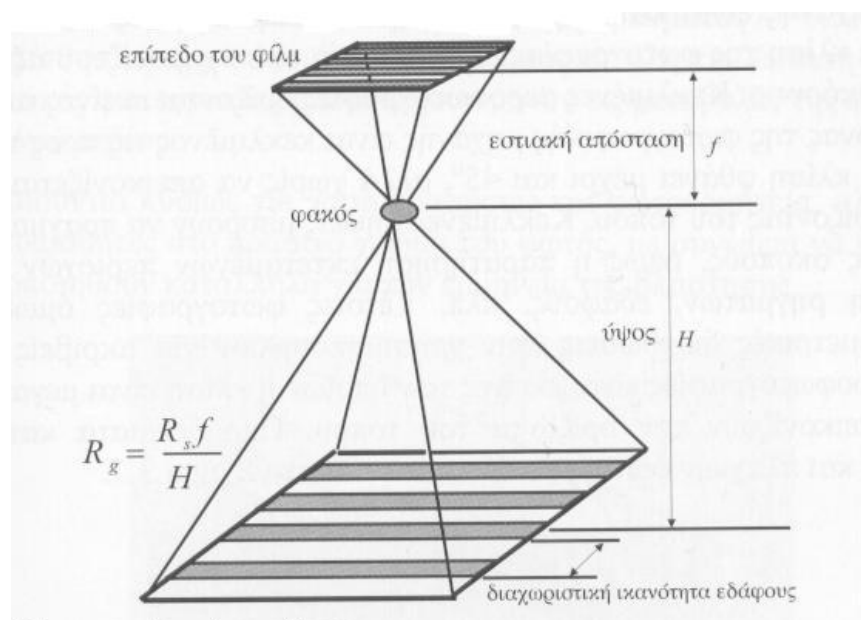
Η ικανότητα διάκρισης είναι η ικανότητα ενός συστήματος απεικόνισης να καταγράφει την παρουσία ή απουσία ενός αντικειμένου, ενώ η ικανότητα αναγνώρισης είναι η ικανότητα αναγνώρισης της ταυτότητας ενός αντικειμένου σε μια εικόνα.

Χαρακτηριστικά αεροφωτογραφιών Εστιακή απόσταση

Κάθε φωτογραφική μηχανή έχει συγκεκριμένο βάθος πεδίου, που είναι συνάρτηση του φακού του συστήματος (Σχήμα 3). Η σχέση μεταξύ της απόστασης a ενός αντικειμένου από τον φακό, της απόστασης b του ειδώλου του από τον φακό και της εστιακής απόστασης/δίδεται από τη σχέση:

$$1/f = 1/a + 1/b$$

Συνεπώς, για έναν δεδομένο φακό όπου το f είναι σταθερό, καθώς αλλάζει η απόσταση a του αντικειμένου, αλλάζει και η απόσταση b του ειδώλου από τον φακό. Για τις αεροφωτογραφίες η απόσταση των αντικειμένων είναι το άπειρο ($a = \infty$), και συνεπώς η απόσταση b των ειδώλων θα πρέπει να είναι ίση με την εστιακή απόσταση f .



(Σχήμα 3)

Έκθεση

Η έκθεση είναι ένα μέτρο της ενέργειας του φωτός που λαμβάνεται σε ένα σημείο στο επίπεδο του φιλμ καθώς το φιλμ εκτίθεται και σχηματίζεται η εικόνα του σημείου πάνω στο φωτογραφικό γαλάκτωμα. Ως έκθεση ορίζεται το γινόμενο της έντασης J του φωτισμού της ακτινοβολίας που προσπίπτει στη φωτοευαίσθητη επιφάνεια επί τον αντίστοιχο χρόνο Δt διάρκειας της έκθεσης.

Όταν η ένταση J του φωτισμού μετρείται σε $[lux]=[lumen/m^2]$, τότε η έκθεση E μετρείται σε $[lux \cdot sec]$ (ή ακόμη και σε μονάδες ακτινοβολίας, όχι όμως σε μονάδες φωτισμού, όπως $[v/1\eta^{-3}]$). Η έκθεση E είναι συνάρτηση της έντασης J της φωτεινότητας του πεδίου σε $[lux]$, της ταχύτητας του διαφράγματος που μετρείται σε χρόνο Δt , της ενεργού διαμέτρου d του φακού σε χιλιοστά (mm) και της εστιακής απόστασης f της μηχανής σε χιλιοστά. Δηλαδή:

Για μια δεδομένη φωτογραφική μηχανή όπου το f είναι σταθερό και με σταθερή ένταση J στη φωτεινότητα του πεδίου, η έκθεση E είναι συνάρτηση του χρόνου έκθεσης Δt (ταχύτητα του διαφράγματος) και της ενεργού διαμέτρου d του φακού. Επομένως, είναι προφανές από την παραπάνω σχέση (3.4) ότι οι διάφοροι συνδυασμοί ενεργών διαμέτρων $\acute{\alpha}$ και του χρόνου έκθεσης Δt μπορεί να δώσουν την ίδια τιμή της έκθεσης E .

Ως διάφραγμα F ή σχετικό άνοιγμα του φακού μιας φωτογραφικής μηχανής ορίζεται συνήθως ο λόγος της εστιακής απόστασης/του φακού προς τη διάμετρο του $\acute{\alpha}$ και δίδεται από την έκφραση:

$$F = f/d$$

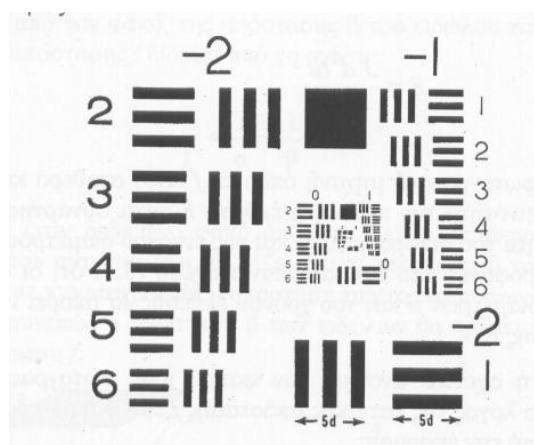
Επειδή η εστιακή απόσταση f είναι σταθερή, η παραπάνω σχέση (3.5) δείχνει ότι όσο η ενεργός διάμετρος d του φακού αυξάνει, τόσο μειώνεται το διάφραγμα F .

3.2.3 Φωτογραφική διαχωριστική ικανότητα

Η διαχωριστική ικανότητα (ή χωρική ανάλυση) των αεροφωτογραφιών εξαρτάται από τη διαχωριστική ικανότητα του φακού, τη διαχωριστική ικανότητα του φιλμ, την επιπεδότητα του φιλμ, τις ατμοσφαιρικές συνθήκες καθώς και την κίνηση και τις διαταράξεις του αεροσκάφους.

Η διαχωριστική ικανότητα του φακού εξαρτάται από την ποιότητα κατασκευής του φακού. Η διαχωριστική ικανότητα εκφράζεται, συνήθως, με τον αριθμό των γραμμών που μπορούν να διακριθούν στη φωτογραφία ανά μονάδα μήκους σε nm (π.χ. 100 [γραμμές/mm], 400 [γραμμές/mm] κοκ.).

Η διαχωριστική ικανότητα του φιλμ εξαρτάται κυρίως από το είδος των κρυσταλλικών φωτοευαίσθητων κόκκων (π.χ., κρυσταλλικοί κόκκοι αλογονιδίων του αργύρου) και από το μέγεθος τους (π.χ., της τάξης του 0,2 [μm]). Γενικά, τα φιλμ με μεγάλες διαστάσεις φωτοευαίσθητων κόκκων έχουν χαμηλή διαχωριστική ισχύ, αλλά είναι ταχύτερα, δηλαδή έντονα ευαίσθητα στο



Στη φωτογραφία, η διαχωριστική ικανότητα και η διαχωριστική ισχύς ορίζονται, επίσης, από τον αριθμό των ζευγαριών των γραμμών ανά μονάδα μήκους που αναγνωρίζονται από τον ανθρώπινο οφθαλμό. Μια κοινή μέθοδος

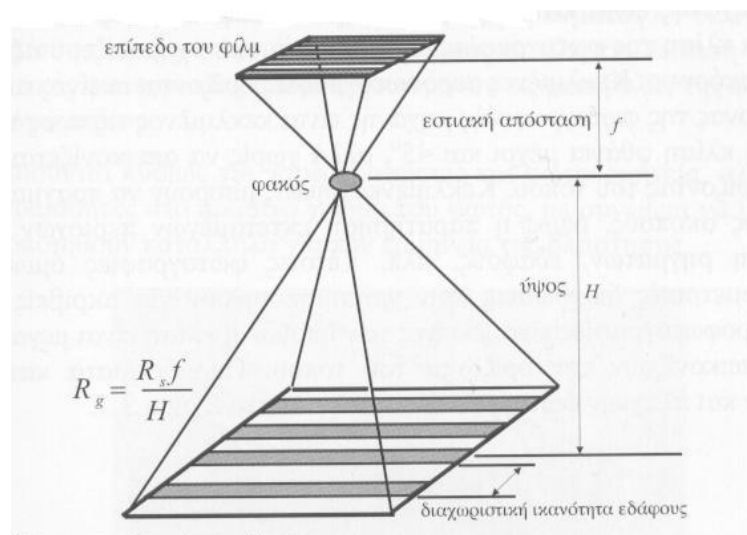
για τη μέτρηση της διαχωριστικής ισχύος είναι να φωτογραφηθεί ένας ειδικός στόχος, όπως αυτός του Σχήματος 3.4, και να προσδιοριστεί ο αριθμός των γραμμών/mm που μπόρεσαν να διαχωριστούν μετά την εμφάνιση του φιλμ. Η διαχωριστική ισχύς P μπορεί να εκφραστεί ως η γωνία μεταξύ του συστήματος απεικόνισης, που βρίσκεται σε απόσταση r από το αντικείμενο, και δύο γραμμικών στόχων που απέχουν απόσταση L μεταξύ τους:

$$P = L/r$$

Συνέπεια του προηγούμενου είναι ότι η διακριτική ικανότητα ή χωρική ανάλυση R_g (απόσταση) του συστήματος στο έδαφος εκφράζεται από την ικανότητα να διαχωριστούν χαρακτηριστικά του εδάφους από αεροφωτογραφίες και εικόνες (Σχήμα 3.5):

$$R_g = R_s \cdot f / H$$

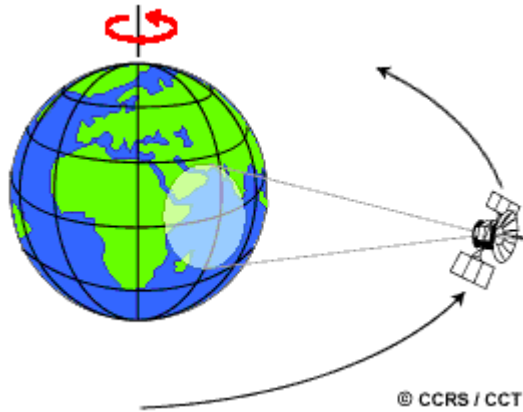
όπου R_g είναι **διακριτική** ικανότητα στο έδαφος σε [γραμμές/m], H είναι το ύψος της μηχανής πάνω από το έδαφος σε [m], L , η διαχωριστική ισχύς του συστήματος σε [γραμμές/mm] και f η εστιακή απόσταση σε (mm).



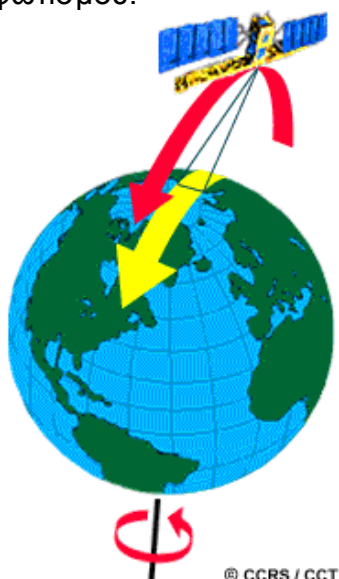
Δορυφορικά Συστήματα Απεικόνισης

Η πορεία που ακολουθείται από έναν δορυφόρο αναφέρεται ως τροχιά του. Οι δορυφορικές τροχιές επιλέγονται ανάλογα με την ικανότητα και το στόχο του αισθητήρα που φέρουν. Η επιλογή τροχιάς μπορεί να ποικίλει από την άποψη του ύψους (το ύψος τους επάνω από τη γήινη επιφάνεια) και του προσανατολισμού και της περιστροφής τους σχετικά με τη γη. Δορυφόροι σε πολύ μεγάλα ύψη, οι οποίοι «βλέπουν» συνεχώς το ίδιο κομμάτι της γήινης επιφάνειας έχουν γεωστατικές τροχιές. Αυτοί οι γεωστατικοί δορυφόροι, σε ύψη περίπου 36.000 χιλιομέτρων, περιστρέφονται με ταχύτητες που ταιριάζουν με την περιστροφή της γης έτσι ώστε αυτοί να φαίνονται στάσιμοι, σχετικά με τη γήινη επιφάνεια. Αυτό επιτρέπει στους δορυφόρους για να παρατηρήσει και να συλλέξει τις πληροφορίες συνεχώς πέρα από τις συγκεκριμένες περιοχές. Οι δορυφόροι καιρού και επικοινωνιών έχουν

συνήθως αυτούς τους τύπους τροχιών. Λόγω της μεγάλης απόστασης τους από τη γήινη επιφάνεια, μερικοί γεωστατικοί καιρικοί δορυφόροι μπορούν να ελέγξουν τα καιρικά και σύννεφων σχέδια που καλύπτουν ένα ολόκληρο ημισφαίριο της γης.

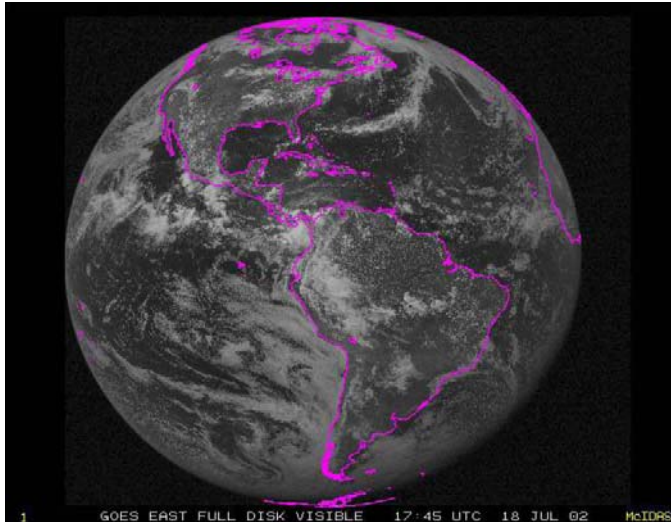


Πολλές πλατφόρμες τηλεπισκόπησης σχεδιάζονται για να ακολουθήσουν μια τροχιά (βασικά βόρρα-νότου) που από κοινού με τη γήινη περιστροφή (δύση-ανατολή), επιτρέπει την κάλυψη του μεγαλύτερου μέρους της γήινης επιφάνειας κατά τη διάρκεια μιας ορισμένης χρονικής περιόδου. Αυτές είναι οι κοντινές-στους πόλους τροχιές, και ονομάζονται έτσι για την κλίση της τροχιάς σχετικά με μια γραμμή που τρέχει μεταξύ του βόρειου και του νότιου πόλου. Πολλές από αυτές τις δορυφορικές τροχιές είναι επίσης σύγχρονες με τον ήλιο έτσι ώστε να καλύπτουν κάθε περιοχή του κόσμου σε μια σταθερή τοπική ώρα της ημέρας. Σε οποιοδήποτε δεδομένο γεωγραφικό πλάτος, η θέση του ήλιου στον ουρανό, καθώς ο δορυφόρος περνά από πάνω, θα είναι η ίδια μέσα στην ίδια εποχή. Αυτό εξασφαλίζει όμοιους όρους φωτισμού κατά τον απόκτηση των εικόνων σε μια συγκεκριμένη εποχή κατά τη διάρκεια των διαδοχικών ετών, ή πέρα από μια ιδιαίτερη περιοχή κατά τη διάρκεια μιας σειράς ημερών. Αυτός είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον έλεγχο των αλλαγών μεταξύ των εικόνων ή για οι παρακείμενες εικόνες μαζί, δεδομένου ότι δεν είναι απαραίτητο να διορθωθούν για τους διαφορετικούς όρους φωτισμού.

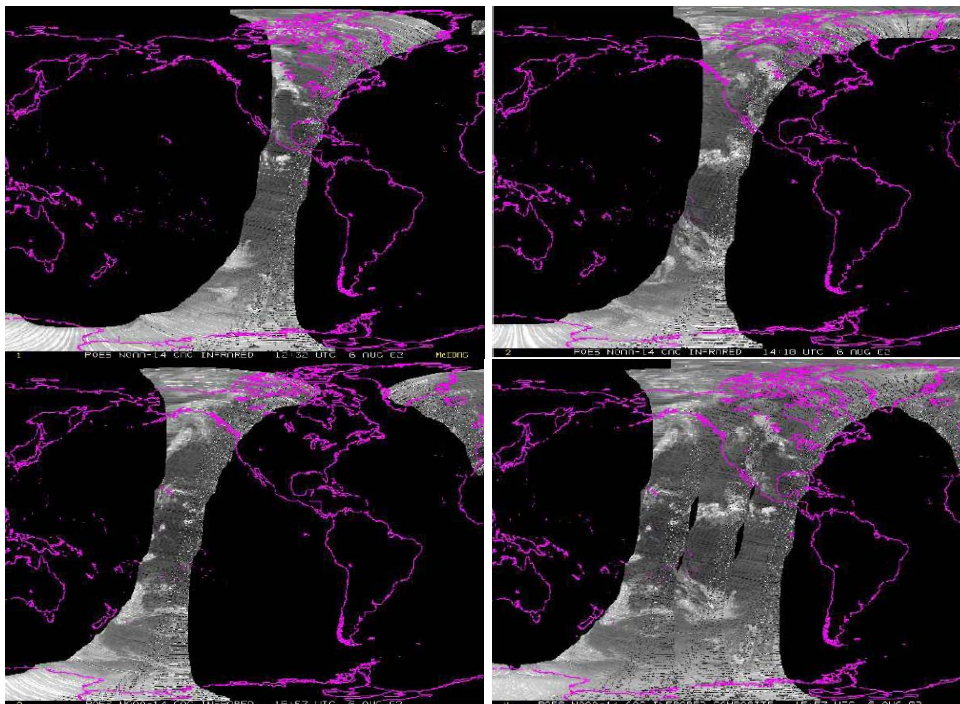


Παραδείγματα από τις δύο παραπάνω κατηγορίες, ανάλογα με την τροχιά, δορυφορικών απεικονιστικών συστημάτων είναι:

Οι δορυφόροι τύπου GOES(**G**eostationary **O**perational **E**nvironmental Satellites), οι οποίοι έχουν τροχιά παράλληλη προς τον Ισημερινό, γωνιακή ταχύτητα ίση με της Γης και στοχεύουν διαρκώς την ίδια περιοχή. Παραδείγματα: GOES (ΗΠΑ), METEOSAT (ESA), GMS (Ιαπωνία).



Οι δορυφόροι τύπου POES(**P**olar **O**perational **E**nvironmental Satellites), οι οποίοι έχουν τροχιά κάθετη προς τον Ισημερινό, πετούν σε χαμηλότερα ύψη, ο χρόνος που χρειάζονται για μια πλήρη περιστροφή είναι 42 min και παράγουν εικόνες μεγαλύτερης ανάλυσης.



Τα πλεονεκτήματα της τηλεπισκόπησης μπορούν να συνοψισθούν στα εξής)Επιτρέπει μεγάλη έως και πλανητική χωρική κάλυψη. β)Επιτρέπει την

μέτρηση – παρατήρηση σε περιοχές που δεν είναι προσβάσιμες για διάφορους λόγους. Ενδεικτικά αναφέρουμε περιπτώσεις στις οποίες η απόσταση ή οι συνθήκες (ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, ραδιενέργεια κ.λπ.) καθιστούν την πρόσβαση απαγορευτική. γ)Επιτρέπει την μείωση του κόστους των μετρήσεων, ελαττώνοντας τον απαιτούμενο χρόνο για την εκτέλεση κάποιων παρατηρήσεων – μετρήσεων.

Από την άλλη μεριά το βασικό πλεονέκτημα της hyperspectral απεικόνισης με επίγεια μέσα είναι η επιτόπια χρήση(in situ), και η άμεση εξαγωγή συμπερασμάτων στον τόπο διεξαγωγής της έρευνας. Το παραπάνω είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην μελέτη φυτικών ιστών και γενικότερα φυτικών οργανισμών, διότι μπορούμε να κάνουμε διάγνωση-παρατήρηση απευθείας στον χώρο καλλιέργειας των φυτών. Το μειονέκτημα όμως τόσο της επίγειας όσο και της υπέργειας υπερφασματικής φασματομετρίας(hyperspectral spectrometry) είναι ότι δεν μπορεί να έχει μεγάλη χωρική πληροφορία και κατά συνέπεια δεν μπορεί να προσδιορίσει την κατανομή των χρωμοφώρων στα φύλλα του φυτού αλλά το μόνο που μπορεί να κάνει είναι βρει μια μέση τιμή του φάσματος και από εκείνα υπολογίσει την μέση τιμή της συγκέντρωσης διάφορων χρωμοφώρων. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι για να επιλυθούν τα διάφορα προβλήματα είναι αναγκαία η χρησιμοποίηση υπερφασματικής φασματοσκοπικής απεικόνισης.

Βιβλιογραφία

1. Peng Gong, Ruiliang Pu, Greg S. Biging, and Mirta Rosa Larrieu, Estimation of Forest Leaf Area Index Using Vegetation Indices Derived From Hyperion Hyperspectral Data, *IEEE Transactions on geosciences and remote sensing*, vol. 41, NO. 6, June 2003
2. Στέλιος Π. Μερτίκας, Τηλεπισκόπηση και ψηφιακή ανάλυση εικόνας, ISBN:960-405-949-1 (1999), εκδόσεις ΙΩΝ.
3. Dan Rahn, Spectral Imaging Puts Plant Health in New Light., *University of Georgia*
4. Douglas C. Youvan, William J. Coleman, Chris M. Silva, Julien Petersen, Edward J. Bylina, Mary M. Yang, Fluorescence Imaging Micro-Spectrophotometer, *Biotechnology et alia*, 1997, 1:1-16

Διαδίκτυο

<http://www.microimages.com>

<http://www.ccrs.nrcan.gc.ca>

<http://www.ag2020.net>

Κεφάλαιο 4^ο

Φασματοσκοπική απεικόνιση, περιγραφή πειραματικής διάταξης και πειραματικής διαδικασίας

Φασματοσκοπία

Η ανάλυση δομικά ανομοιογενών φυσικών αντικειμένων, όπως είναι οι φυτικοί ιστοί, απαιτεί την ανάπτυξη απεικονιστικών συστημάτων ικανών να παράσχουν πληροφορίες για την σύσταση και την δομή τους σε κάθε χωρικό σημείο της υπό ανάλυση περιοχής. Ουσιαστικά το ζητούμενο στις εφαρμογές αυτές είναι η ανάπτυξη μιας νέας τεχνολογίας μέσω της οποίας θα καθίσταται δυνατή η μέτρηση των φασματικών χαρακτηριστικών ενός μεγάλου αριθμού σημείων του υπό εξέταση ανομοιογενούς πεδίου, ταυτόχρονα και εξ αποστάσεως. Αντίστοιχο αποτέλεσμα με την συμβατική τεχνολογία θα μπορούσε να επιτευχθεί με την χρήση ενός μεγάλου αριθμού φασματομέτρων (πάνω από 500.000) σε παράλληλη διάταξη, όπου κάθε ένα από αυτά καταγράφει φασματική πληροφορία από ένα επιμέρους χωρικό σημείο. Είναι προφανές ότι η προσέγγιση αυτή είναι ασύμφορη και πρακτικά μη υλοποιήσιμη. Η προσπάθεια συνδυασμένης καταγραφής χωρικής και φασματικής πληροφορίας ξεκίνησε εδώ και αρκετά χρόνια με κύριο πεδίο εφαρμογής τις επιστήμες περιβάλλοντος και της τηλεπισκόπησης. Οι πρώτες προσεγγίσεις βασίζονταν στην χρήση δέσμης οπτικών ινών σε γραμμική διάταξη η οποία μετέφερε το ανακλώμενο φως από μια διαμήκη περιοχή του εξεταζόμενου πεδίου σε έναν μονοχρωμάτορα. Η διάταξη αυτή επιτρέπει την καταγραφή φασματικής πληροφορίας κατά μήκος της μίας χωρικής διάστασης. Η καταγραφή 2-διάστατης πληροφορίας απαιτεί σάρωση του πεδίου κατά μήκος της άλλης διάστασής του, η οποία στις προαναφερθείσες εφαρμογές εξασφαλίζεται με την κίνηση της φέρουσας το σύστημα πλατφόρμας (π.χ. δορυφόρος). Είναι προφανές ότι η τεχνολογία αυτή απαιτεί απόλυτη σταθερότητα σχετικής θέσης της μετρητικής διάταξης σε σχέση με την μετρούμενη περιοχή. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι δεν είναι δυνατή η σε πραγματικό χρόνο παρατήρηση και η καταγραφή της εικόνας του αντικειμένου μια και αυτή μπορεί να κατασκευαστεί από την χωρική κατανομή των φασματικών εντάσεων και μόνο μετά την ολοκλήρωση της χωρικής σάρωσης. Πέραν του κόστους και της απαιτούμενης υπολογιστικής ισχύος τα προαναφερθέντα τεχνικά χαρακτηριστικά δεν ικανοποιούν τις απαιτήσεις ενός μεγάλου αριθμού δυνατικών εφαρμογών. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια άρχισε να διερευνάται η δυνατότητα χρήσης 2-διάστατων απεικονιστικών ανιχνευτών για την καταγραφή διακεκριμένων φασμάτων σε κάθε εικονοστοιχείο τους. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη απεικονιστικών μονοχρωμάτορων οριοθετώντας την σύνθεση διαφόρων μεθόδων και τεχνολογιών απεικόνισης και φασματοσκοπίας και την ανάπτυξη συστημάτων πολυφασματικής και υπερφασματικής απεικόνισης με σαφώς αναβαθμισμένες διαγνωστικές δυνατότητες. Στα συστήματα πολυφασματικής απεικόνισης, οι απεικονιστικοί μονοχρωμάτορες οι σχετικά απλές διατάξεις και επιτρέπουν την λήψη εικόνων σε δέκα ή λιγότερες διαφορετικές περιοχές του οπτικού

φάσματος. Αντίθετα στην περίπτωση της Υπερφασματικής απεικόνισης οι μονοχρωμάτορες επιτρέπουν την λήψη διαδοχικών εικόνων σε 30-100 διαφορετικές περιοχές του οπτικού φάσματος και ως εν τούτου η τεχνολογία τους πολύ υψηλού επιπέδου και σε αρκετές περιπτώσεις αξιόπιστη. Η υπάρχουσα τεχνολογία συστημάτων Υπερφασματικής Απεικόνισης συνίσταται ουσιαστικά σε ειδικά φίλτρα τα οποία συζεύγονται οπτικά με απεικονιστικούς ανιχνευτές οι οποίοι καταγράφουν τις διερχόμενες από το φίλτρο στενές φασματικά εικόνες. Τα εν λόγω φίλτρα έχουν την ιδιότητα να αλλάζουν την φασματική περιοχή στα οποία αυτά είναι διαπερατά, κάτω από την επίδραση μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι, αντί της χωρικής σάρωσης η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην φασματική σάρωση, η οποία επιτρέπει την παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο και την καταγραφή στενών φασματικά εικόνων με την δυνατότητα άμεσης επιλογής του μήκους κύματος απεικόνισης. Ακόμη, παρέχεται η δυνατότητα αποθήκευσης διαδοχικών εικόνων κατά μήκος του φάσματος με αρκετά μεγάλη ταχύτητα και δυνητικά ο μετέπειτα υπολογισμός των φασμάτων σε διάφορα χωρικά σημεία από τις καταχωρημένες εικόνες. Οι βασικές τεχνολογίες μεταβλητών οπτικών φίλτρων οι οποίες έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα είναι:

- **Συμβολομετρικά μεταβλητά φίλτρα**
- **Ακουστοοπτικά φίλτρα (AOTF)**
- **Φίλτρα υγρών κρυστάλλων (LCTF)**

Παρά το γεγονός ότι οι τεχνολογίες αυτές αποτελούν ένα σοβαρό βήμα προς τα εμπρός, παρέχοντας λύσεις σε μια σειρά εφαρμογών, εν τούτοις υπόκεινται σε σημαντικούς περιορισμούς μερικοί από τους οποίους είναι:

- Χαρακτηρίζονται από χαμηλή διαπερατότητα. Έτσι η λήψη εικόνων σε αρκετές περιοχές του φάσματος απαιτεί τον έντονο φωτισμό των αντικείμενων. Αυτό όμως, πέραν της πιθανότητας πρόκλησης θερμικών αλλοιώσεων στο αντικείμενο, μπορεί, να οδηγήσει στην καταστροφή του φίλτρου, λόγω αύξησης της θερμοκρασίας στο ενεργό τους υλικό. Συνεπώς σε κάποιες φασματικές περιοχές είναι πρακτικά μη χρησιμοποιήσιμα.
- Χαρακτηρίζονται από μεγάλες μεταβολές της διαπερατότητάς τους, κατά μήκος της φασματικής περιοχής λειτουργίας τους.
- Έχουν μικρό σχετικά φασματικό εύρος λειτουργίας, με συνέπεια να είναι δυνατή η επιλογή μηκών κύματος εντός μια στενής σχετικά φασματικής περιοχής. (το εύρος της συνήθως είναι περίπου ίσο με το διπλάσιο του μικρότερου (διερχόμενου) μήκους κύματος).
- Κατά την διάρκεια της φασματικής σάρωσης λαμβάνει χώρα χωρική μετατόπιση των εικόνων οι οποίες λαμβάνονται σε διαφορετικές φασματικές περιοχές. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι να ακυρώνεται ουσιαστικά η δυνατότητα υπολογισμού φασμάτων σε επιμέρους χωρικά σημεία από τις αποθηκευμένες (μη αντιστοιχήσιμες) εικόνες.
- Χαρακτηρίζονται από μεγάλο μέγεθος και κόστος.

Η υπέρβαση των περιορισμών αυτών και η ανάπτυξη νέας, ανταγωνιστικής τεχνολογίας στον εν λόγω τομέα αποτελεί αντικείμενο συστηματικής

ερευνητικής και αναπτυξιακής δραστηριότητας. Ορισμένα από τα αποτελέσματα της προσπάθειας αυτής παρατίθενται στην συνέχεια.

Οι μεθοδολογίες και οι τεχνολογίες αυτές, καθώς και η καινοτόμος οργανολογία αναπτύχθηκαν αρχικά με σκοπό την χρήση τους σαν ερευνητικά εργαλεία, για την ανάπτυξη νέων μεθόδων και συστημάτων για την επί τόπου, μη επεμβατική διάγνωση και χαρτογράφηση προκαρκινικών αλλοιώσεων σε πρώιμο (θεραπεύσιμο) στάδιο. Οι ιδιαίτερες απαιτήσεις των βιοϊατρικών εφαρμογών (μεγάλη ανομοιογένεια ιστών, μικροκινήσεις (αναπνοή) του εξεταζόμενου, ανάγκη για προσαρμογή σε μικροσκοπία και ενδοσκοπία κλπ) καταδείξανε τις ανεπάρκειες των υπάρχοντων συστημάτων και ανέδειξαν την ανάγκη ανάπτυξης νέας τεχνολογίας στην περιοχή της Φασματικής Απεικόνισης. Η ανταπόκριση στην τεχνολογική αυτή πρόκληση οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς καινοτόμων, φορητών συστημάτων Υπερφασματικής Απεικόνισης νέας τεχνολογίας με πολύ μεγάλες διαγνωστικές δυνατότητες, τα οποία υπερέχουν σαφώς του ανταγωνισμού. Ειδικότερα η νέα αυτή τεχνολογία παρέχει τις εξής δυνατότητες:

- Μεγάλη διαπερατότητα σε στενές φασματικές περιοχές, μεγάλη ταχύτητα μεταβολής του μήκους κύματος απεικόνισης, αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Σχεδόν σταθερή διαπερατότητα κατά μήκος της φασματικής περιοχής λειτουργίας τους
- Έχουν πολύ μεγάλο φασματικό εύρος λειτουργίας το οποίο εκτείνεται από το υπεριώδες μέχρι το 1 μm με δυνατότητα επέκτασης
- Δεν λαμβάνει χώρα χωρική μετατόπιση των εικόνων κατά τη διάρκεια της φασματικής σάρωσης με αποτέλεσμα να υπολογίζονται με τρόπο άμεσο τα φάσματα σε κάθε επιμέρους χωρικό σημείο από τις αποθηκευμένες (πλήρως αντιστοιχίσιμες) εικόνες.
- Μπορούν να λειτουργήσουν σαν απλοί viewers (φακοί μεταβλητού μήκους κύματος απεικόνισης)
- Είναι μικρών διαστάσεων (μπορούν να λειτουργήσουν με μπαταρία και φορητούς υπολογιστές)
- Έχουν χαμηλό κόστος κατασκευής.

Τα χαρακτηριστικά αυτά εισάγουν νέα δεδομένα στους τομείς της ηλεκτρονικής απεικόνισης, της τεχνητής όρασης και της αναλυτικής οργανολογίας. Τα αναπτυχθέντα συστήματα Υπερφασματικής Απεικόνισης επιτρέπουν την καταγραφή εικόνων με πολύ μικρό φασματικό εύρος και ενός πλήρους φάσματος ανάκλασης, απορρόφησης ή φθορισμού σε κάθε εικονοστοιχείο. Σε ελάχιστο χρόνο καταγράφονται άνω του ενός εκατομμυρίου φάσματα τα οποία αντιστοιχούν σε ισάριθμα χωρικά σημεία της υπό εξέταση περιοχής, ενώ η ανάλυση της φασματικής πληροφορίας επιτρέπει την εξ αποστάσεως ανίχνευση, ταυτοποίηση και χαρτογράφηση των δομικών συστατικών ανομοιογενών αντικειμένων. Έτσι, αντικείμενα ίδιου χρώματος αλλά διαφορετικής χημικής σύνθεσης και δομής αναγνωρίζονται και διαφοροποιούνται άμεσα όταν αυτά παρατηρούνται σε κατάλληλες φασματικές περιοχές. Οι φασματικές αυτές περιοχές προσδιορίζονται με την συγκριτική ανάλυση των φασματικών χαρακτηριστικών διάφορων οικογενειών υλικών με κοινά χρωματικά και διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά με την

χρήση των εν λόγω συστημάτων. Πέραν της άμεσης οπτικής διαφοροποίησης των υλικών αυτών παρέχεται η δυνατότητα ταυτοποίησης τους με βάση τη ταυτόχρονα λαμβανόμενη φασματική πληροφορία. Με δεδομένη την φορητότητα και την ευελιξία τους, τα συστήματα αυτά είναι πολύτιμα εργαλεία για την επίλυση ανιχνευτικών και διαγνωστικών προβλημάτων σε διάφορες επίγειες, υπέργειες και υποθαλάσσιες εφαρμογές. Ένα τυπικό παράδειγμα χρήσης τους αποτελεί η αξιοποίηση των σαφώς αναβαθμισμένων δυνατοτήτων της τεχνολογίας αυτής στην εξ αποστάσεως αναγνώριση και ταυτοποίηση φυσικά ή τεχνητά κρυμμένων (καμουφλαρισμένων) αντικειμένων.

Οι διαγνωστικές δυνατότητες των συστημάτων αυτών αναβαθμίζονται ουσιαστικά με τον συνδυασμό τους με απεικονιστικά συστήματα ευαίσθητα σε ευρεία φασματική περιοχή (από 190 nm έως 15 μm). Η οπτική σύζευξη των αναπτυσθέντων μεταβλητών, υπολογιστικά ελεγχόμενων οπτικών φίλτρων με τους απεικονιστικούς αυτούς ανιχνευτές συνιστούν μοναδική καινοτομία με εντυπωσιακές διαγνωστικές δυνατότητες. Η Υπερφασματική Απεικόνιση ευρέως φάσματος αποτελεί ένα αναντικατάστατο ερευνητικό εργαλείο γενικής χρήσης και επιτρέπει την εξ αποστάσεως ανάλυση πολύπλοκων αντικειμένων και την ανάπτυξη τυποποιημένων διαγνωστικών μεθόδων και διαδικασιών (απεικόνιση σε συγκεκριμένες φασματικές περιοχές) ανάλογα με την οικογένεια υλικών που ενδιαφέρει σε κάθε επιμέρους εφαρμογή. Οι τυποποιημένες αυτές διαδικασίες ενσωματώνονται σε απεικονιστικά (συνήθως πολυφασματικά) διαγνωστικά συστήματα τα οποία εξειδικεύονται στις ανάγκες της κάθε επιμέρους εφαρμογής. Συνεπώς η νέα αυτή τεχνολογία Υπερφασματικής απεικόνισης συνιστά την πλατφόρμα ανάπτυξης ενός μεγάλου αριθμού καινοτόμων διαγνωστικών μεθόδων και οργάνων, χρήσιμων σε μια πλειάδα των εφαρμογών.

Πειραματική διάταξη

Τυπικά το υλικό των συστημάτων (HySI) περιλαμβάνει έναν ανιχνευτή απεικόνισης που συνδέεται με έναν μονοχρωμάτορα απεικόνισης, οι οποίοι και οι δύο διασυνδέονται με έναν υπολογιστή και με τις μονάδες ελέγχου. Ο μονοχρωμάτορας απεικόνισης είναι το βασικό συστατικό σε οποιοδήποτε είδος συστήματος (HySI). Λειτουργεί σαν μεταβλητό οπτικό φίλτρο, κάνοντας δυνατή την επιθεώρηση και σύλληψη πολλαπλών φασματικών εικόνων σε στενές φασματικές ζώνες σε όλο το εύρος της περιοχής συντονισμού ή, εάν ο συντονισμός της φασματικής ανάλυσης είναι υψηλός, ένα πλήρες φάσμα ανά εικονοκύτταρο εικόνας.

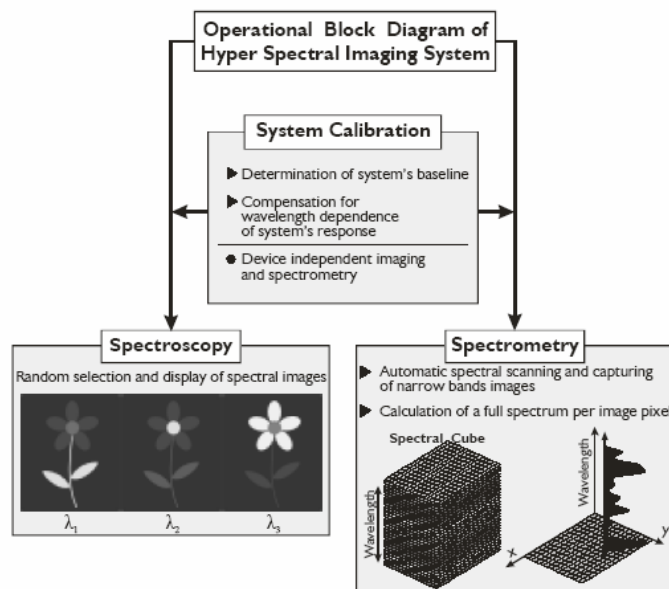
Οι διαθέσιμοι μονοχρωμάτορες απεικόνισης έχουν προσαρμοστεί για να συμμορφωθούν με τις ανάγκες ποικίλων διαφορετικών εφαρμογών, που κυμαίνονται από την αστρονομία ως τη μικροσκοπία. Όσον αφορά στις βιοϊατρικές επιστήμες, τα (HySI) συστήματα, βασισμένα στους προαναφερθέντες μονοχρωμάτορες, έχουν βρει ενδιαφέρουσες εφαρμογές, κυρίως στη μικροσκοπία. Η ολοκλήρωση των τεχνολογιών (HySI) στα κοινά οπτικά μικροσκόπια, οδηγούν στην ανάπτυξη ενός πολύτιμου διαγνωστικού εργαλείου και τα πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα έχουν καταδείξει τη μεγάλη δυνατότητα της φασματικής απεικόνισης στη μικροσκοπία. Αφ' ετέρου

διάφοροι περιορισμοί αυτών των συσκευών έχουν αναφερθεί όπως η περιορισμένη φασματική έκταση(AOTFs, LCTFs), χαμηλή ρυθμοαπόδοση (AOTFs, LCTFs), εικόνα που μετατοπίζεται κατά τη διάρκεια ρύθμισης του μήκους κύματος(AOTFs), μη-πραγματική χρονική φασματική απεικόνιση (FTI), χρονοβόρα απόκτηση (FTI). Επιπλέον τα σχετικά εξαρτήματα-όργανα είναι σε όλες τις περιπτώσεις ακριβά, λεπτά και περίπλοκα. Αυτοί οι τεχνολογικοί περιορισμοί αποτρέπουν τη δυνατότητα εφαρμογής αυτών των συστημάτων στην in vivo(εντός του οργανισμού), μη καταστρεπτική ανάλυση των ζωντανών ιστών. Σε αυτόν τον τομέα εφαρμογής, οι απαιτήσεις για την απόδοση συστημάτων είναι υψηλές, επειδή, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στη μικροσκοπία, η γεωμετρία φωτισμός-απεικόνιση δεν μπορεί να ελεγχθεί με μεγάλη ακρίβεια.

Η φασματική ανάλυση των ζωντανών ιστών απαιτεί την ανάπτυξη προηγμένων μονοχρωματόρων απεικόνισης που πρέπει να συνδυάζουν τα ακόλουθα τεχνικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα: α) φασματική απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο για την επιθεώρηση και την εστίαση, β) υψηλή φασματική ανάλυση και ευρεία φασματική έκταση, γ) υψηλή ρυθμοαπόδοση προκειμένου να αποφευχθούν η μακροχρόνια έκθεση και έντονη διέγερση από το φως, δ) γρήγορη σύλληψη των ακολουθιών εικόνας έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επιρροή των μικροκινήσεων στην εγγραφή της εικόνας. Σε μία προσπάθεια να καλυφθούν αυτές οι τεχνικές απαιτήσεις, έχουμε αναπτύξει ένα υπερφασματικό σύστημα απεικόνισης, βασισμένο σε έναν όλο-οπτικό μονοχρωμάτορα απεικόνισης. Η μετατόπιση των οπτικών στοιχείων των πιο πρόσφατων αποτελεσμάτων στο συντονισμό του μήκους κύματος απεικόνισης εκτελείται με τη βοήθεια μηχανικών χειριστών που ελέγχονται από το PC μέσω ενός μικροελεγκτή. Το σύστημα είναι σε θέση να παράγει φασματικές εικόνες 5nm Full Width Half Maximum (FWHM), με βήμα ρύθμισης 3nm, στη φασματική ζώνη 400-1000nm. Στο συγκεκριμένο στήσιμο του συστήματος το βήμα ρύθμισης είναι 20 nm. Η ελάχιστη εκπομπή (transmittance) είναι 40% στα πλαίσια του λειτουργικού φασματικού εύρους της, η οποία καθορίζει την υψηλή ρυθμοαπόδοση του αναπτυγμένου μονοχρωμάτορα. Ο συντονισμός του φασματικού εύρους ζώνης ταιριάζει με το φασματικό εύρος της δυνατότητας απόκρισης(responsivity) του CCD(charge couple device) αλλά μπορεί να επεκταθεί και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, μέχρι τη μέση-υπέρυθρη περιοχή. Το παραγόμενο σήμα ανατροφοδότησης του μονοχρωμάτορα φέρει τις πληροφορίες για την κατάσταση του tunable φίλτρου, επιτρέποντας κατά συνέπεια το συγχρονισμό του με τη διαδικασία σύλληψης της εικόνας. Ο μονοχρωμάτορας είναι συνδεδεμένος με μια ασπρόμαυρη, megapixel, φωτογραφική μηχανή CCD, βασισμένη στο πρωτόκολλο μετάδοσης δεδομένων 1394 της IEEE, το οποίο δύναται να παράγει τις εικόνες σε ένα ποσοστό 15 frames/s σε πλήρη ανάλυση και περισσότερων από 30 frames/s σε ανάλυση VGA.

Ένα ειδικά αναπτυγμένο λογισμικό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της φωτογραφικής μηχανής και του μονοχρωμάτορα καθώς επίσης και για τη φασματική ανάλυση εικόνας. Το *σχέδιο 1* επεξηγεί γραφικά τα κύρια λειτουργικά χαρακτηριστικά. Το σύστημα λειτουργεί σε δύο καταστάσεις: την κατάσταση της φασματοσκοπίας και την κατάσταση της φασματομετρίας. Η πρώτη επιτρέπει την τυχαία επιλογή και την απεικόνιση, σε πραγματικό

χρόνο, των επιθυμητών φασματικών εικόνων, ενώ η κατάσταση της φασματομετρίας εκτελεί συγχρονισμένα τη φασματική σύλληψη και ανίχνευση της εικόνας και, τελικά, τον υπολογισμό ενός πλήρους φάσματος ανά εικονοκύτταρο εικόνας.



σχέδιο 1.

Και στις δύο περιπτώσεις, μια ειδική διαδικασία βαθμονόμησης εκτελείται πριν από αυτές τις διαδικασίες απεικόνισης, προκειμένου να αντισταθμιστεί η εξάρτηση μήκους κύματος της απόκρισης των ηλεκτροπτικών μερών του συστήματος, όπως το CCD, τα φωτιστικά, κ.λπ.... Ένα άσπρο πιάτο $Ba_2 SO_4$ με ενιαίο συντελεστή ανάκλασης στη φασματική ζώνη 380-1000 nm χρησιμοποιείται ως δείγμα βαθμονόμησης. Το δείγμα τοποθετείται στο οπτικό πεδίο του φακού και η γκρίζα αξία του κεντρικού τομέα της εικόνας αναπαρίσταται σε πραγματικό χρόνο. Κατόπιν ο μονοχρωμάτορας ανιχνεύει τη συνολική φασματική ζώνη και σε κάθε βήμα το διάφραγμα (shutter) και το gain της κάμερας είναι αυτόματα ρυθμισμένα έτσι ώστε η επιδειχθείσα γκρίζα αξία να πλησιάζει την αξία 255. Αυτό εξασφαλίζει ότι η δυναμική περιοχή του CCD αξιοποιείται πλήρως. Οι τιμές των shutter και gain, που χρησιμοποιούνται για να λάβουν το γκρίζο επίπεδο 255, αποθηκεύονται σε κάθε μήκος κύματος-βήμα, μαζί με την εικόνα του άσπρου δείγματος, αποτελώντας το σύνολο των στοιχείων βαθμονόμησης του συστήματος. Αυτές οι ρυθμίσεις καθορίζουν το επίπεδο ευαισθησίας της φωτογραφικής μηχανής, η οποία αυξάνεται όσο το μήκος κύματος απεικόνισης συντονίζεται σε μικρότερα ή μεγαλύτερα μήκη κύματος από τη ζώνη μηκών κύματος στην οποία η μέγιστη ρυθμοαπόδοση του φωτός και η αποδοτικότητα του συστήματος λαμβάνονται. Αυτό καθιστά την απόκριση του συστήματος σχεδόν ανεξάρτητη από το μήκος κύματος, εξασφαλίζοντας κατά συνέπεια φασματική απεικόνιση και φασματομετρία ανεξάρτητες από τη συσκευή. Οι αποθηκευμένες φασματικές εικόνες του άσπρου δείγματος χρησιμοποιούνται προκειμένου να διορθώσουν τον ανωμαλία της φωτεινότητας της εικόνας λόγω της ανομοιόμορφη συνάρτησης μεταφοράς της οπτικής (flat field correction).

Με το τρέξιμο του τμήματος κώδικα για την κατάσταση της φασματομετρίας, που ακολουθεί τη διαδικασία βαθμονόμησης, το σύστημα εκτελεί συγχρονισμένα τη ρύθμιση του μήκους κύματος απεικόνισης της εικόνας και τη σύλληψη της εικόνας ενώ αποθηκεύει την υπό εξέταση περιοχή. Σε κάθε βήμα, η ευαισθησία της φωτογραφικής μηχανής είναι αυτόματα ρυθμισμένη σύμφωνα με τις αποθηκευμένες τιμές του διαφράγματος (shutter) και του κέρδους (gain). Από τον αποθηκευμένο σωρό των φασματικών εικόνων, ένα φάσμα μπορεί να υπολογιστεί και να επιδειχθεί σε οποιοδήποτε επιλεγμένο από το χρήστη χωρικό σημείο της εικόνας. Τα φάσματα υπολογίζονται από τις γκρίζες τιμές της επιλεγμένης φασματικής στήλης εικονοκυττάρου. Η χωρική ανάλυση του ανιχνευτή καθορίζει τον αριθμό των φασμάτων που μπορούν να συλλεχθούν σε ένα τρέξιμο πειράματος. Με την περιγεγραμμένη διαμόρφωση, ένα εκατομμύριο φάσματα μπορούν να συλλεχθούν σε περίπου δύο λεπτά χρόνου ανίχνευσης. Το σύστημα ενσωματώνει επίσης μια γρήγορη διαδικασία αποταμίευσης σε μικρότερη ανάλυση (VGA).

Διαχωριστική ικανότητα και δειγματοληψία

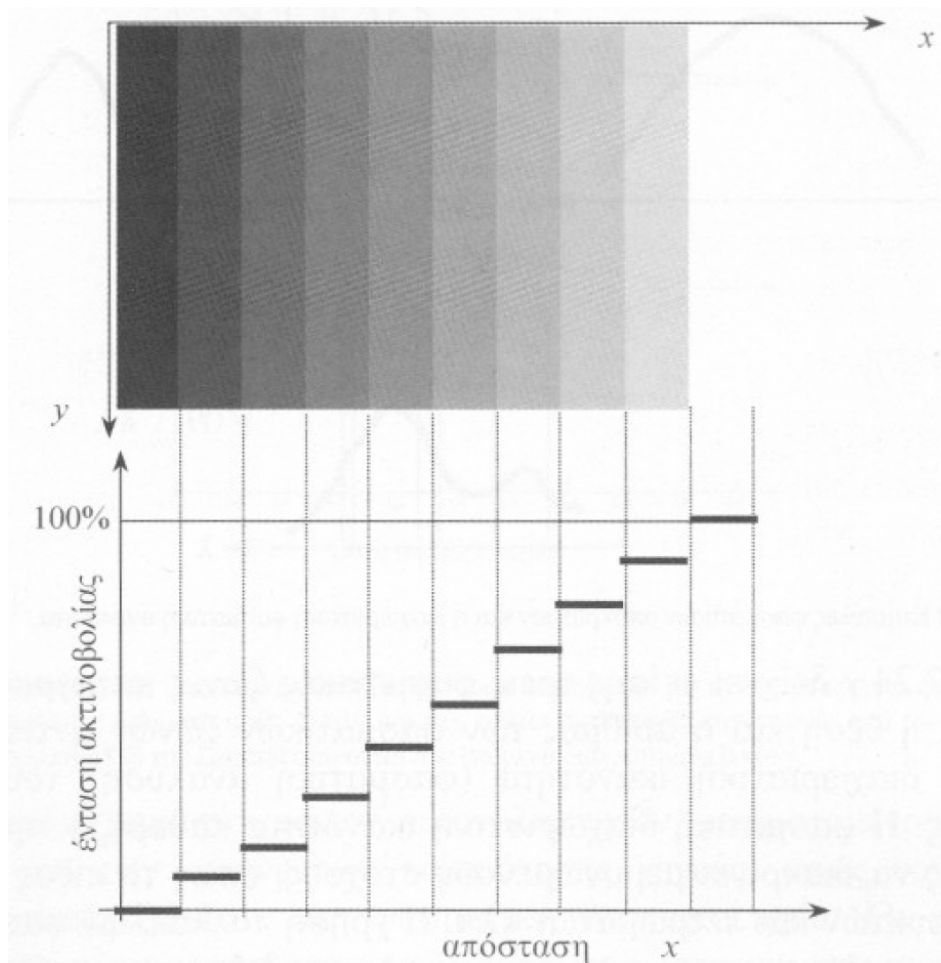
Η εικόνα αναφέρεται στη συνάρτηση δύο μεταβλητών της έντασης της ακτινοβολίας $f(x,y)$ όπου τα x, y συμβολίζουν συντεταγμένες και η τιμή f της συνάρτησης είναι ανάλογη της φωτεινότητας της εικόνας στη συγκεκριμένη θέση (x,y) .

Για να γίνει σωστή επεξεργασία της εικόνας με υπολογιστές, είναι αναγκαίο η συνάρτηση $f(x,y)$ να ψηφιοποιηθεί. Ψηφιακή εικόνα είναι η εικόνα $f(x,y)$ που έχει μετατραπεί από αναλογική σε διακριτή συνάρτηση και ως προς τις συντεταγμένες (x,y) και ως προς την ένταση f της ακτινοβολίας. Η ψηφιακή, λοιπόν, εικόνα θεωρείται ένας πίνακας που οι στήλες και οι γραμμές του αντιστοιχούν στις συντεταγμένες της εικόνας, ενώ κάθε στοιχείο του αντιστοιχεί στην τιμή του τόνου του γκρι για αυτό το σημείο. Τα στοιχεία μιας τέτοιας ψηφιακής διάταξης ονομάζονται εικονοστοιχεία ή Ψηφίδες (picture elements ή pixels). Ψηφιοποίηση ως προς τις συντεταγμένες (x,y) της εικόνας ονομάζεται δειγματοληψία της εικόνας, ενώ ψηφιοποίηση του πλάτους της έντασης της ακτινοβολίας ονομάζεται ψηφιοποίηση ή κβαντοποίηση του επιπέδου του γκρι. Το σχήμα 2 δείχνει μια αντιστοιχία της συνάρτησης φωτεινότητας με τη διαβάθμιση του τόνου του γκρι.

Με άλλα λόγια, ψηφιακή εικόνα δεν είναι τίποτα άλλο από μια νέα συνάρτηση $DN(i,j)$, όπου οι συντεταγμένες (x,y) έχουν μετατραπεί σε ακέραιους αριθμούς (i,j) και η ένταση f είναι τώρα μια συνάρτηση με ακέραια τιμή DN (Digital Number) του επιπέδου του γκρι. Η διαδικασία της ψηφιοποίησης απαιτεί στην πράξη ποσότητες που είναι ακέραιες δυνάμεις του δύο, δηλαδή:

$$DN=2^k$$

όπου DN συμβολίζει τον αριθμό των επιπέδων του γκρι και k είναι ο βαθμός της διαβάθμισης. Για παράδειγμα στην κβαντοποίηση της φωτεινότητας των 8-bit αντιστοιχούν $2^8 = 256$ διαβαθμίσεις για την καταγραφή της έντασης, με $DN(i,j)=0$ να αντιστοιχεί στο μαύρο της εικόνας (μηδενική ανάκλαση-φωτεινότητα) και $DN(i,j) = 255$ να αντιστοιχεί στο λευκό (μέγιστη φωτεινότητα).

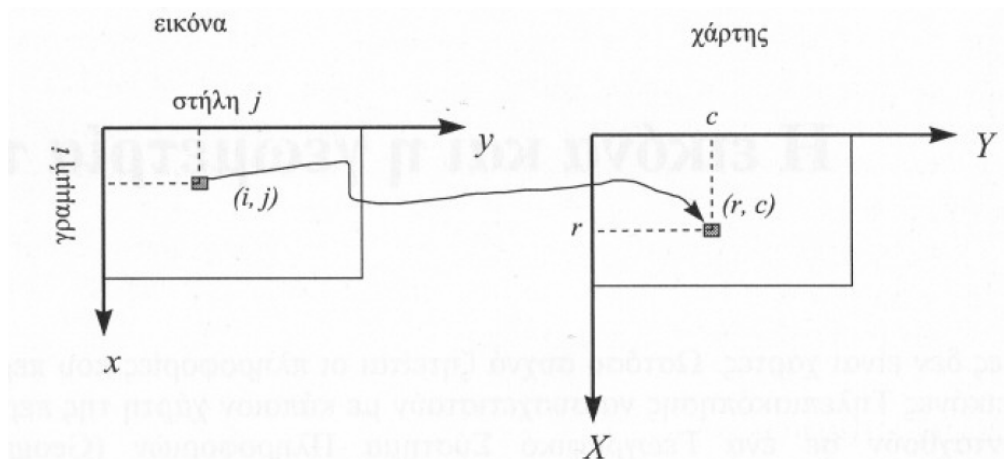


σχήμα 2. Παράδειγμα ψηφιοποίησης συναρτήσεων φωτεινότητας.

Δύο παράγοντες είναι σημαντικοί για την ποιότητα και το περιεχόμενο της εικόνας: η διαχωριστική ικανότητα και η συχνότητα δειγματοληψίας. Η **διαχωριστική ικανότητα** αναφέρεται στη μέγιστη ανάλυση μιας μέτρησης και σχετίζεται με την ικανότητα ενός συστήματος να διαχωρίζει αντικείμενα. Διακρίνεται σε φασματική, ραδιομετρική, χωρική και διαχρονική διαχωριστική ικανότητα. Συχνότητα δειγματοληψίας είναι η ταχύτητα συλλογής των δεδομένων. Διακρίνεται και αυτή σε φασματική, χωρική και διαχρονική συχνότητα δειγματοληψίας.

Ψηφιακές εικόνες

Για λόγους απλοποίησης των υπολογισμών, το σύστημα συντεταγμένων μιας ψηφιακής εικόνας επιλέγεται με τους άξονες όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Κάθε ψηφίδα (pixel) της εικόνας έχει συντεταγμένες (x,y) , στο σύστημα της εικόνας, με διακριτές τιμές (i,j) , που αντιστοιχούν σε δειγματοληψία του χώρου της γήινης επιφάνειας. Οι τιμές της κλίμακας του γκρι $g(x,y)$ των ψηφίδων προσδιορίζονται από τη μέση τιμή της έντασης της ακτινοβολίας της επιφάνειας. Η τιμή της κάθε ψηφίδα ονομάζεται φωτεινότητα και αντιστοιχεί στο επίπεδο διαβάθμισης του γκρι (δυναμικό εύρος). Στην πολυφασματική εικόνα μια ψηφίδα διαθέτει περισσότερες από μία τιμές φωτεινότητας (ή επίπεδα διαβάθμισης του γκρι).



Το σύστημα συντεταγμένων μιας ψηφιακής εικόνας.

Κάθε τιμή φωτεινότητας $g_p(x,y)$ αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη φασματική ζώνη q ($q = 1,2,3, \dots, p$) και όλα τα επίπεδα του γκρι μπορούν να θεωρηθούν ως ένα διάνυσμα g των τιμών της φωτεινότητας της ψηφίδα.

Στην ψηφιακή εικόνα υπάρχουν δύο έννοιες που είναι σημαντικές: ο **χώρος της εικόνας** (image space) και ο **χώρος των γνωρισμάτων** της (feature space). Ο χώρος της εικόνας αναφέρεται στις χωρικές συντεταγμένες της εικόνας, συμβολίζεται με $I(x,y)$, και περιέχει $m \times n$ στοιχεία, όπου m και n είναι ο αριθμός των γραμμών i και των στηλών j της εικόνας αντίστοιχα. Επομένως, τα στοιχεία στον χώρο της εικόνας είναι:

$$I(x,y) = I(i,j), \quad i=1,2,\dots,m \quad j=1,2,\dots,n$$

Ο χώρος αυτός $I(x,y)$ αντιπροσωπεύει τις μονάδες της χωρικής δειγματοληψίας, σε κάθε μία από τις οποίες καταγράφηκε η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ή άλλα φαινόμενα. Όλες οι πιθανές τιμές $g(x,y)$ της φωτεινότητας των ψηφίδων συνιστούν τον χώρο V των γνωρισμάτων της εικόνας. Αν υπάρχουν P φασματικές ζώνες, τότε δημιουργείται ο χώρος V , P διαστάσεων. Κάθε στοιχείο g του συνόλου V είναι τότε ένας **φασματικός κύβος** (κύβος πολλαπλών διαστάσεων), οι συντεταγμένες του οποίου είναι το διάνυσμα:

$$g = (g_1, g_2, \dots, g_p)^T$$

όπου ο εκθέτης T δείχνει ανάστροφο. Κάθε ψηφίδα (x,y) στον χώρο της εικόνας διαθέτει ένα και μόνο ένα διάνυσμα g στο χώρο των γνωρισμάτων. Διαφορετικές ψηφίδες μπορεί να έχουν το ίδιο διάνυσμα στον χώρο των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων. Στον χώρο των γνωρισμάτων της εικόνας μπορούν να επιτελεστούν διάφορες επεξεργασίες, όπως αυτή της ταξινόμησης. Ταξινόμηση είναι η διαδικασία εκείνη η οποία ομαδοποιεί διανύσματα g παρόμοιων ή όμοιων επιπέδων του γκρι και τα καταχωρεί στην ίδια ομάδα (γνώρισμα). Η απόφαση για την ταξινόμηση λαμβάνεται για κάθε ψηφίδα (x,y) της εικόνας στον χώρο των γνωρισμάτων V , ενώ το αποτέλεσμα της ταξινόμησης αντιπροσωπεύεται στο χώρο της εικόνας $I(x,y)$.

Πειραματική διαδικασία

Ο στόχος της πειραματικής διαδικασίας είναι να παρακολουθήσουμε την συμπεριφορά φυτικών ιστών σε συνθήκες καταπόνησης(stress). Για να επιτύχουμε αυτό το στόχο επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε φυτά καπνού διότι θεωρούνται φυτά πρότυπα. Επίσης αναπτύσσονται αρκετά γρήγορα, έχουν πλατιά φύλλα, κατάλληλα για απεικόνιση και δεν χρειάζονται ιδιαίτερη φροντίδα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη από τα φυτά καπνού:

α) Άγρια φυτά

β) Γενετικά τροποποιημένα(βλ. παράρτημα για την γενετική τροποποίηση)

Αρχικά φυτεύσαμε σπόρους των φυτών σε μικρές γλάστρες και η διαδικασία λήψης απεικονίσεων ξεκίνησε όταν αναπτύχθηκαν σε ικανό μέγεθος, περίπου δεκαπέντε μέρες μετά την φύτευση. Ύστερα από δέκα μέρες μεταφυτεύσαμε μερικά από τα παραπάνω φυτά, και των δύο ειδών, σε μεγαλύτερες γλάστρες και αρχίσαμε να τα ποτίζουμε με μίγμα βαρέων μετάλλων, κυρίως καδμίου. Η διαδικασία των μετρήσεων κράτησε περισσότερο από ένα μήνα και παίρναμε μετρήσεις σχεδόν κάθε μέρα.

Η καταπόνηση στην οποία υποβλήθηκαν τα φυτά είναι δύο ειδών. α) Καταπόνηση λόγω χώρου, άρα ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών στο χώμα(αργότερα όλα τα φυτά μεταφυτεύτηκαν). β) Καταπόνηση λόγω του μίγματος των βαρέων μετάλλων.

Η διαδικασία των μετρήσεων είναι ιδιαίτερα απλή. Τοποθετούμε την γλάστρα με το φυτό σε έναν ειδικά διαμορφωμένο πάγκο. Φωτίζουμε το δείγμα-φυτό με λάμπες αλογόνου. Ρυθμίζουμε την κάμερα, η οποία βρίσκεται σε κατακόρυφη θέση σε σχέση με το φυτό, ανάλογα με την απόσταση και την εστίαση. Εκτελούμε την μέτρηση με το αντίστοιχο λογισμικό της κάμερας, από την οποία παράγεται ο φασματικός κύβος, και τέλος παίρνουμε μια έγχρωμη φωτογραφία του φυτού.



Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας των μετρήσεων αντιμετωπίσαμε αρκετά προβλήματα. Το κυριότερο πρόβλημα είναι η μετατόπιση, σε βάθος χρόνου, των φύλλων των φυτών λόγω της ανάπτυξης του φυτού, άρα δεν είναι δυνατόν να εξασφαλίσουμε με ακρίβεια ίδιες συνθήκες φωτισμού για όλες τις μετρήσεις κάθε μέρα, βέβαια αυτό όπως θα δούμε παρακάτω δεν αποτελεί σημαντικό σφάλμα στην όλη διαδικασία. Εξίσου σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η μετατόπιση των εικόνων σε κάθε μήκος κύματος λήψης, λόγω της μετατόπισης των οπτικών φίλτρων της κάμερας, η οποία οφείλεται στην περιστροφή της ταινίας που συγκρατεί τα φίλτρα. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με τη διαδικασία του registration. Αναλυτικότερα τοποθετούμε ένα πρότυπο και εκτελούμε μια σειρά λήψεων (μέτρηση) και αποθηκεύουμε τα δεδομένα. Το λογισμικό της κάμερας από αυτή τη λήψη υπολογίζει της μικρομετατοπίσεις και έτσι ρυθμίζει τη λήψη σε κάθε μήκος κύματος ώστε να μην έχουμε μετατόπιση της συνολικής εικόνας. Αυτή τη διαδικασία την εκτελούμε κάθε φορά που αλλάζουμε θέση στην κάμερα.

Βιβλιογραφία

1. Costas Balas, Vassilis Papadakis, Nicolas Papadakis, Antonis Papadakis, Eleftheria Vazgiouraki, George Themelis, A novel hyper-spectral imaging apparatus for the non-destructive analysis of objects of artistic and historic value, *Journal of Cultural Heritage* 4 (2003) 330s–337s
2. C. Balas, G. Themelis, A. Papadakis, E. Vasgiouraki, A. Argyros, E. Koumantakis, A. Tosca, E. Helidonis, A Novel Hyper-Spectral Imaging System : Application on in-vivo Detection and Grading of Cervical Precancers and of Pigmented Skin Lesions.
3. Στέλιος Π. Μερτίκας, Τηλεπισκόπηση και ψηφιακή ανάλυση εικόνας, ISBN:960-405-949-1 (1999), εκδόσεις ΙΩΝ.

Κεφάλαιο 5^ο

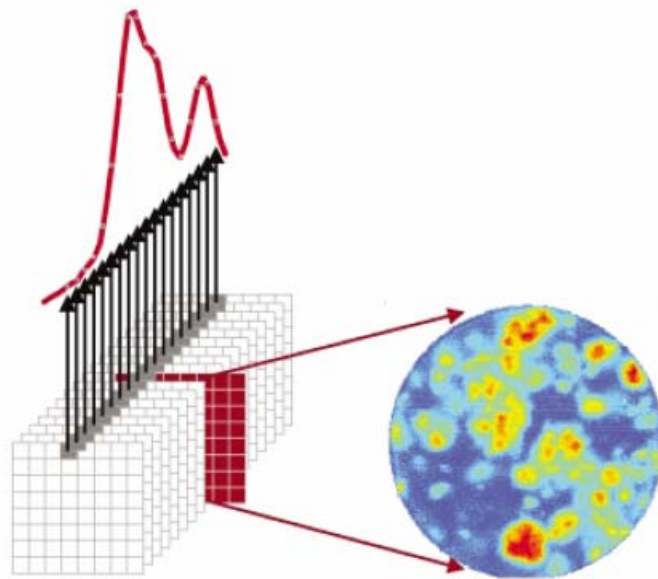
Χημική χαρτογράφηση, παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Εισαγωγικά

Η χημική φασματοσκοπία απεικόνισης είναι μια νέα συναρπαστική αναλυτική μέθοδος η οποία μπορεί να απαντήσει σε συχνά ερωτώμενες ερωτήσεις, όπως ποια χημικά είδη είναι στο α δείγμα, πόσο από το καθένα είναι παρών, και επιπλέον, πού εντοπίζεται χωρικά καθένα από αυτά; Μέσω της παραδοσιακής υπέρυθρης φασματοσκοπίας η οποία συγκεντρώνει τεράστιες μικροσκοπικές και μακροσκοπικές ικανότητες απεικόνισης, η χημική απεικονιστική φασματοσκοπία απαντά σε όλες αυτές τις ερωτήσεις ταυτόχρονα, σε μια ενιαία γρήγορη μέτρηση. Η χημική απεικόνιση επιτρέπει στον ερευνητή να λάβει χωρικές και φασματικές πληροφορίες που χαρακτηρίζουν τα δείγματα με πρωτοφανή ευκολία, ταχύτητα και υψηλή χωρική και φασματική ανάλυση. Η μεθοδολογία αυτή στοχεύει στην παροχή περιεκτικής ανάλυσης σύνθετου ετερογενών οργανισμών όπως είναι οι φυτικοί ιστοί.

Η χημική απεικόνιση έχει προωθηθεί σημαντικά με την εμπορευματοποίηση από τις υπέρυθρες εστιακές κάμερες(FPAs), οι οποίες είναι φωτογραφικές μηχανές που αποτελούνται από πολλές χιλιάδες μεμονωμένους υπέρυθρους ανιχνευτές. Όταν μια τέτοια κάμερα σχεδιάζεται για να λειτουργεί στο υπέρυθρο και παράλληλα έχει επιλογή ρύθμισης του μήκους κύματος, αυτά τα όργανα παρέχουν μια εικόνα όπου η ποικίλη αντίθεση(contrast) προέρχεται από την μοναδική υπέρυθρη χημική υπογραφή, που είναι χαρακτηριστική για κάθε συστατικό μέσα στο δείγμα. Στατιστικά εργαλεία μπορούν να ενισχύσουν αυτούς τους χημικούς χάρτες με την μείωση των βημάτων που χρειάζονται για να προσδιορίσουμε και να εξάγουμε χρήσιμες πληροφορίες.

Η απεικόνιση στο υπέρυθρο και κοντινό υπέρυθρο, ειδικότερα, έχει την πειραματική ευελιξία να χαρακτηριστεί μια ευρεία ποικιλία δειγμάτων χημικά, με τη χρησιμοποίηση μετρήσεων εκπομπής και ανάκλασης. Οι υπέρυθρες φωτογραφικές μηχανές μεγάλου σχήματος, ιδιαίτερα στο κοντινό υπέρυθρο, παρέχουν υψηλή πιστότητα εικόνας. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται τα κατά μετασχηματισμό Φουριέ φασματόμετρα και τα LCTF's. Στην πραγματικότητα, τα εμπορικότερα διαθέσιμα φασματικά συστήματα απεικόνισης έχουν φασματική ανάλυση συγκρίσιμη με εκείνη των συμβατικών φασματόμετρων. Αυτός ο τύπος οργανολογίας έχει αρχίσει ήδη για να αντικαθιστά τις χρονοβόρες τεχνικές χαρτογράφησης, ιδιαίτερα στην περιοχή του υπέρυθρου, στην οποία τα δεδομένα καταγράφουν ένα φάσμα τη φορά και η εικόνα κατασκευάζεται με την κίνηση του δείγματος σε ένα επίπεδο x,y.



σχήμα 1

Το θεμέλιο της χημικής απεικόνισης είναι η έννοια ενός χημικού χάρτη. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1, μια χημική απεικόνιση που αποτελείται από ένα σύνολο στοιχείων αντιπροσωπεύεται από έναν τρισδιάστατο κύβο όπου οι δύο άξονες περιγράφουν την κάθετη και οριζόντια χωρική διάσταση και η τρίτη διάσταση αντιπροσωπεύει το φασματικό μήκος κύματος. Η ένταση ενός εικονοκύτταρου σχεδιάζεται συναρτήσει του μήκους κύματος και αναπαριστά ένα φάσμα. Εντάσεις για όλα τα εικονοκύτταρα σε ένα ενιαίο μήκος κύματος αναπαριστούν μια εικόνα της απορρόφησης ή της ανάκλασης σε μια συγκεκριμένη φασματική ζώνη. Η διάσταση του μήκους κύματος είναι εκείνη που απεικονίζει τη χημική ιδιομορφία με το διαχωρισμό των διαφορετικών χημικά ειδών σε διαφορετικές φασματικές περιοχές του χημικού φασματικού κύβου εικόνας.

Ποικίλες αναλυτικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απεικονιστούν και να επεξεργαστούν διάφορα σύνολα στοιχείων εικόνας χημικών ουσιών. Οι απλοί χημικοί χάρτες σε γκριζα κλίμακα μπορούν να κατασκευαστούν από μια απλή εικόνα. Για πιο λεπτομερή αντίθεση, η χαρτογράφηση της μεμονωμένης εικόνας στο κόκκινο, στο πράσινο και στο μπλε (RGB) κανάλι μπορεί να δημιουργήσει το σύνθετες πολυχρωματικές χημικές εικόνες. Μεμονωμένες χημικές εικόνες μπορούν να διαιρεθούν μεταξύ τους προκειμένου να επιτύχουμε φασματική κανονικοποίηση και απομονωθούν περαιτέρω τα συστατικά που μας ενδιαφέρουν. Αυτοί οι τύποι μεταβλητών προσεγγίσεων λειτουργούν καλά για τα είδη με μοναδικές φασματικές υπογραφές. Για τις περιπτώσεις με σημαντική φασματική επικάλυψη (spectral overlap), αρκετά συχνό φαινόμενο στο κοντινό υπέρυθρο, είναι απαραίτητες στατιστικές-μαθηματικές προσεγγίσεις. Επιπλέον, αφού απομονωθούν οι φασματικές πληροφορίες που είναι μοναδικές στο δείγμα που μας ενδιαφέρει, μπορούμε να εφαρμόσουμε μεθόδους επεξεργασίας των δεδομένων και στατιστική ανάλυση ώστε να ποσοτικοποιήσουμε διάφορα χαρακτηριστικά και δομικά γνωρίσματα.

Χημική χαρτογράφηση (chemical imaging)

Η καινοτομία αυτής της εργασίας είναι η ομαδοποίηση της χωρικής πληροφορίας που πήραμε από τις φασματικές εικόνες κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Τα φάσματα που περιέχονται σε κάθε φασματική μέτρηση τα ομαδοποιήσαμε ανάλογα με τους αλγόριθμους για την ποσοτική εκτίμηση του περιεχομένου των φύλλων σε χρωμοφόρες και στη συνέχεια με τη βοήθεια λογισμικού χαρτογραφήσαμε αυτά τα δεδομένα πάνω στις φασματικές εικόνες με τη χρήση ενός ψευδοχρωματικού κώδικα. Αναλυτικότερα εισάγαμε σε ένα λογισμικό την πληροφορία από τους φασματικούς κύβους και μέσω των αλγορίθμων, που θα αναλύσουμε παρακάτω, υπολογίσαμε τις τιμές συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και της αναλογίας καρωτενοειδών/χλωροφύλλης και την προβάλλαμε στην επιφάνεια των φύλλων των φυτών.

Η σημασία αυτής της διαδικασίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό δομικών χαρακτηριστικών των φύλλων των φυτών είναι τεράστια για διαγνωστικούς λόγους και μπορεί να επεκταθεί με τη χρήση κατάλληλων αλγορίθμων και στο προσδιορισμό άλλων δομικών χαρακτηριστικών πέρα από την χλωροφύλλη και τα καρωτενοειδή (πχ για τον προσδιορισμό της ανθοκυανίνης). Η διαδικασία για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διάφορων δομικών χαρακτηριστικών με την παραπάνω μέθοδο είναι ιδιαίτερα απλή και άμεσα εφαρμόσιμη σε επιτόπιες μετρήσεις. Με λίγα λόγια ένας γεωπόνος, βιολόγος ή οποιοσδήποτε άλλος ερευνητής που δεν έχει καμία σχέση με την φασματική απεικόνιση θα μπορεί με μεγάλη ευκολία και ακρίβεια να συγκεντρώσει πληροφορίες για τη παθολογική κατάσταση φυτών, είτε στον αγρό είτε στο εργαστήριο, και στη συνέχεια να προχωρήσει σε αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και έγκαιρη διάγνωση κλινικών φαινομένων.

Αλγόριθμοι για την ποσοτική εκτίμηση του περιεχομένου σε χρωμοφόρες (χλωροφύλλη, καρωτενοειδή).

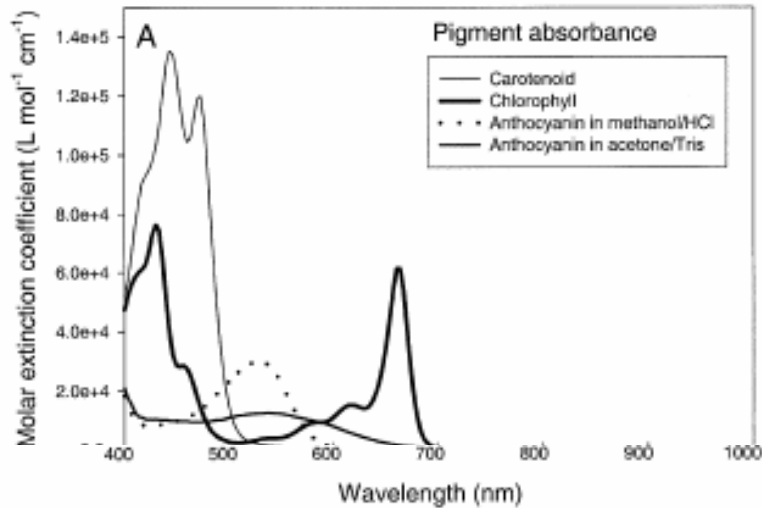
Ένας μεγάλος αριθμός φασματικών δεικτών έχει αναπτυχθεί για την εκτίμηση της περιεκτικότητας του φύλλου σε χρωστικές ουσίες. Εντούτοις, στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί οι δείκτες έχουν εξεταστεί μόνο για ένα ή το πολύ-πολύ για μερικά είδη φυτών, και έτσι δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορα είδη με ποικίλα δομικά χαρακτηριστικά φύλλων. Ποσοτικοποιήσαμε το βαθμό φασματικής παρέμβασης μεταξύ των χρωστικών ουσιών όταν περισσότερες από μία χρωστικές ουσίες εμφανίζονται μέσα στον ίδιο ιστό φύλλων. Διαπιστώσαμε ότι οι προηγουμένως δημοσιευμένοι φασματικοί δείκτες παρείχαν σχετικά φτωχό συσχετισμό με την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη φύλλων όταν εφαρμόζεται η χρήση τους, σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών τύπων ειδών και φυτών. Ο συντελεστής ανάκλασης επιφάνειας φύλλων εμφανίζεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας σε αυτήν την παραλλαγή. Με την ανάπτυξη ενός νέου φασματικού δείκτη που μειώνει την επίδραση των διαφορών στο συντελεστή ανάκλασης της επιφάνειας του φύλλου, ήμαστε σε θέση να βελτιώσουμε σημαντικά τους συσχετισμούς με την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Επίσης διαπιστώσαμε ότι ένας δείκτης βασισμένος στην πρώτη

παράγωγο του συντελεστή ανάκλασης στην άκρη της κόκκινης περιοχής του φάσματος (red edge), ήταν αναίσθητος στη δομική παραλλαγή των φύλλων. Η παρουσία άλλων χρωστικών ουσιών δεν επηρέασε σημαντικά την εκτίμηση της χλωροφύλλης από τη φασματική ανάκλαση. Εντούτοις, διαπιστώσαμε ότι ο φωτοχημικός δείκτης συντελεστή ανάκλασης (PRI, αρχικά αναπτυγμένος για την εκτίμηση ξανθοφύλλης, xanthophyll) αφορούσε την αναλογία καρωτενοειδούς/χλωροφύλλης στα πράσινα φύλλα. Αυτό το αποτέλεσμα έχει μεγάλη σημασία για την ερμηνεία του PRI που μετρείται και στις μεγάλες και μικρές κλίμακες. Τα αποτελέσματά των ερευνών καταδεικνύουν ότι οι φασματικοί δείκτες μπορούν να εφαρμοστούν σε είδη με ποικίλη δομή φύλλων χωρίς την ανάγκη για εκτενή βαθμονόμηση (calibration) για κάθε είδος. Αυτό ανοίγει νέες δυνατότητες για αξιολόγηση της υγείας βλάστησης στα ετερογενή φυσικά περιβάλλοντα.

Λόγω της σημασίας των χρωστικών ουσιών για τη λειτουργία των φύλλων, οι παραλλαγές στην περιεκτικότητα σε χρωστικές ουσίες μπορούν να παρέχουν τις πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογική κατάσταση των φύλλων. Η χλωροφύλλη τείνει να μειωθεί γρηγορότερα από τα καρωτενοειδή όταν τα φυτά είναι κάτω από την πίεση ή κατά τη διάρκεια γήρανσης των φύλλων.

Χλωροφύλλη

Οι χλωροφύλλες έχουν τα ισχυρά μέγιστα σημεία απορροφητικότητας στο κόκκινο και στις μπλε περιοχές του φάσματος (σχέδιο 1). Αφού στο μπλε έχουμε μέγιστες επικαλύψεις με την απορροφητικότητα των καρωτενοειδών, δεν χρησιμοποιείται γενικά αυτή η φασματική ζώνη για την εκτίμηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη. Η μέγιστη απορροφητικότητα στην κόκκινη περιοχή εμφανίζεται μεταξύ 660 και 680 nm. Εντούτοις, ο συντελεστής ανάκλασης σε αυτά τα μήκη κύματος δεν έχει αποδειχθεί τόσο χρήσιμος για την πρόβλεψη της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη όπως έχει ο συντελεστής ανάκλασης σε ελαφρώς μεγαλύτερα ή μικρότερα μήκη κύματος. Αυτό συμβαίνει επειδή το σχετικά χαμηλό περιεχόμενο χλωροφύλλης είναι επαρκές για να προκαλέσει κορεσμό στην απορρόφηση στην περιοχή 660-680nm, μειώνοντας κατά συνέπεια την ευαισθησία στο υψηλό περιεχόμενο χλωροφύλλης των φασματικών δεικτών, που είναι βασισμένοι σε αυτά τα μήκη κύματος. Συνεπώς, εμπειρικά μοντέλα για την πρόβλεψη της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη από την ανάκλαση είναι κατά ένα μεγάλο μέρος βασισμένα στο συντελεστή ανάκλασης στις περιοχές των 550 ή 700 nm, όπου προκειμένου να κορεστεί η απορρόφηση, απαιτείται μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη.



Σχέδιο 1

Τρεις αρχικοί τύποι δεικτών (απλή αναλογία [SR], ομαλοποιημένη διαφορά [NDVI], και η κόκκινη άκρη) έχουν αναπτυχθεί για εκτίμηση της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη (δείτε τον πίνακα 1 για την περίληψη από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την μελέτη). Ένας δείκτης SR διαιρεί χαρακτηριστικά το συντελεστή ανάκλασης σε ένα μήκος κύματος αναφοράς, (R_{ref} , μεταξύ 750 και 900 nm) από ένα μήκος κύματος το οποίο είναι δείκτης (R_{index} , μεταξύ 660 και 720 nm) αν και το αντίστροφο αυτής της σχέσης είναι επίσης δυνατό.

$$SR_{index} = R_{ref} / R_{index}$$

Τα καταλληλότερα μήκη κύματος είναι α) $R_{ref} = 680 \text{ nm}$ και $R_{index} = 800 \text{ nm}$ και β) $R_{ref} = 705 \text{ nm}$ και $R_{index} = 750 \text{ nm}$ (Gitelson and Merzylak(1996)).

Οι δείκτες βασισμένοι στην ομαλοποιημένη διαφορά χρησιμοποιούν τα ίδια μήκη κύματος με το SR αλλά αφαιρούν, παρά διαιρούν, το R_{index} από το R_{ref} . Κατόπιν η αξία ομαλοποιείται με τη διαίρεση από το άθροισμα του συντελεστή ανάκλασης στα ίδια δύο μήκη κύματος. Αυτοί οι δείκτες έχουν την ακόλουθη γενική μορφή.

$$ND_{index} = (R_{ref} - R_{index}) / (R_{ref} + R_{index})$$

Προκειμένου να αντισταθμιστεί ο υψηλός συντελεστής ανάκλασης της επιφάνειας των φύλλων, ο οποίος τείνει να αυξήσει το συντελεστή ανάκλασης σε όλο το εύρος του ορατού φάσματος, κάνουμε τις περαιτέρω τροποποιήσεις στους παραπάνω γενικούς δείκτες. Η προσθήκη μιας σταθεράς σε όλες τις τιμές του συντελεστή ανάκλασης μειώνει και τον SR και τον ND ακόμα και όταν δεν υπάρχει καμία αλλαγή στην ικανότητα απορρόφησης των φυτικών ιστών κάτω από την επιδερμίδα. Για να αφαιρεθεί αυτή η επίδραση, επιλέξαμε το R_{445} ως μέτρο του συντελεστή ανάκλασης επιφάνειας, διότι σε αυτό το μήκος κύματος απορροφούν πολύ και η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή με αποτελέσματα τον ελάχιστο συντελεστή ανάκλασης σε αυτήν την περιοχή του φάσματος. Έτσι έχουμε:

$$mSR_{index} = (R_{ref} - R_{445}) / (R_{index} - R_{445})$$

$$ND_{index} = (R_{ref} - R_{index}) / (R_{ref} + R_{index} - 2 R_{445})$$

Ένας ακόμα δείκτης που αφορά την εκτίμηση του περιεχομένου των φύλλων σε χλωροφύλλη είναι ο παρακάτω. Αποδείχθηκε ότι ο αντίστροφος συντελεστής ανάκλασης $(R_{\lambda})^{-1}$ στη φασματική ζώνη από 520 έως 550 nm και 695 έως 705 nm είναι σχετικός με τη συνολική περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη στα φύλλα όλων των ειδών. Η αφαίρεση στο κοντινό υπέρυθρο με τον αντίστροφο συντελεστή ανάκλασης, $(R_{NIR})^{-1}$, από $(R_{\lambda})^{-1}$ παράγει το δείκτη $[(R_{\lambda})^{-1} - (R_{NIR})^{-1}]$, ο οποίος είναι γραμμικά ανάλογος προς τη συνολική περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη στις φασματικές ζώνες από 525 έως 555nm και από 695 έως 725 nm. Για να ρυθμίσει τις διαφορές στη δομή των φύλλων, χρησιμοποιήθηκε το προϊόν του προηγούμενου δείκτη και ο συντελεστής ανάκλασης στο NIR $[(R_{\lambda})^{-1} - (R_{NIR})^{-1}] * R_{NIR}$, αυτό αύξησε περαιτέρω την ακρίβεια στην εκτίμηση της χλωροφύλλης στη φασματική ζώνη από 520 έως 585 nm και από 695 έως 740 nm. Έτσι έχουμε

$$\text{Reciprocal reflectance} = (R_{NIR}/R_{\lambda}) - 1,$$

με καταλληλότερα μήκη κύματος $(R_{NIR}/R_{520-585}) - 1$, $(R_{NIR}/R_{695-740}) - 1$

Καρωτενοειδή

Η εκτίμηση της περιεκτικότητας των φύλλων σε καρωτενοειδή, από το συντελεστή ανάκλασης είναι πολύ δυσκολότερη από την εκτίμηση της χλωροφύλλης. Αυτό συμβαίνει λόγω της επικάλυψης των μέγιστων απορρόφησης μεταξύ της χλωροφύλλης και του καρωτενοειδούς (σχέδιο 1) και λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης της χλωροφύλλης από τα καρωτενοειδή στα περισσότερα φύλλα. Συνεπώς, οι δείκτες συντελεστή ανάκλασης έχουν αποδειχθεί επιτυχέστεροι για την εκτίμηση της αναλογίας των καρωτενοειδών προς τη χλωροφύλλη, απ' ότι στην εκτίμηση της απόλυτης συγκέντρωσης καρωτενοειδών (Merzlyak et al, 1999 Penuelas, Baret & Filella, 1995). Οι περισσότεροι δείκτες για την εκτίμηση της αναλογίας καρωτενοειδών/χλωροφύλλης είναι με βάση τη σύγκριση του συντελεστή ανάκλασης στην περιοχή της μέγιστης απορρόφησης των καρωτενοειδών (400-500 nm) με το συντελεστή ανάκλασης στην κόκκινη περιοχή, ο οποίος επηρεάζεται μόνο από τη χλωροφύλλη. Παρακάτω θα εξετάσουμε τρεις δείκτες

α) τον SIPI, "structure-insensitive pigment index" (Penuelas et al.) β) τον PSRI, "plant senescence reflectance index" (Merzlyak) και γ) τον PRI, "photochemical reflectance index" (Gamon, Penuelas). Αυτοί οι δείκτες καθορίζονται ως εξής

$$SIPI = (R_{800} - R_{445}) / (R_{800} - R_{680})$$

$$PSRI = (R_{680} - R_{500}) / R_{750}$$

$$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} - R_{570})$$

Τελευταίος δείκτης για την εκτίμηση του περιεχομένου των φύλλων σε καρωτενοειδή είναι ο δείκτης του ανάστροφου συντελεστή ανάκλασης που αναφέρεται και παραπάνω και διαμορφώνεται ως εξής:

$$\text{reciprocal reflectance} = R_{\text{NIR}}(1/R_{510} - 1/R_{550})$$

Ανακεφαλαιώνοντας έχουμε τον παρακάτω πίνακα

συγγραφείς	Gamon, Sims(2001)	Gitelson & Merzlyak, (1994, 2002)
Συγκέντρωση Chl	$mSR_{705} = (R_{750} - R_{445}) / (R_{705} + R_{445})$	$Chl\ NDI = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705})$
	$mND = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705} - 2R_{445})$	$Reciprocal\ reflectance = (R_{\text{NIR}}/R_{\lambda}) - 1$ $(R_{\text{NIR}}/R_{520-585}) - 1, (R_{\text{NIR}}/R_{695-740}) - 1$
Αναλογία Car\Chl	$SIPI = (R_{800} - R_{445}) / (R_{800} + R_{680})$	$R_{\text{NIR}}(1/R_{510} - 1/R_{550})$, reciprocal reflectance
	$PSRI = (R_{680} - R_{500}) / R_{750}$	$PRI = (R_{530} - R_{570}) / (R_{530} + R_{570})$

Οι δείκτες των Gamon, Sims είναι ανεξάρτητοι από την επιφάνεια και τη δομή του φύλλου καθώς και από τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού(Gamon & Sims (2001)). Οι δείκτες των Gitelson & Merzlyak είναι δοκιμασμένοι σε τέσσερα είδη φύλλων(σφενδάμου, κάστανου, άγριας αμπέλου και οξιάς) με διαφορετική περιεκτικότητα και σύνθεση σε χρωστικές ουσίες, και λειτουργούν περίπου με την ίδια ακρίβεια και για τα τέσσερα.

Τελικά επιλέγουμε τους δείκτες mND για την εκτίμηση του περιεχομένου σε χλωροφύλλη και SIPI για την εκτίμηση της αναλογίας car/chl. Παράλληλα έχουμε κάνει κάποιες μετατροπές στους αλγόριθμους για να συμβαδίζουν με τα τεχνικά χαρακτηριστικά της κάμερας. Δηλαδή οι αλγόριθμοι έχουν ως εξής:

$$mND = (R_{800} - R_{700}) / (R_{800} + R_{700} - 2 * R_{440})$$

$$SIPI = (R_{800} - R_{440}) / (R_{800} + R_{680})$$

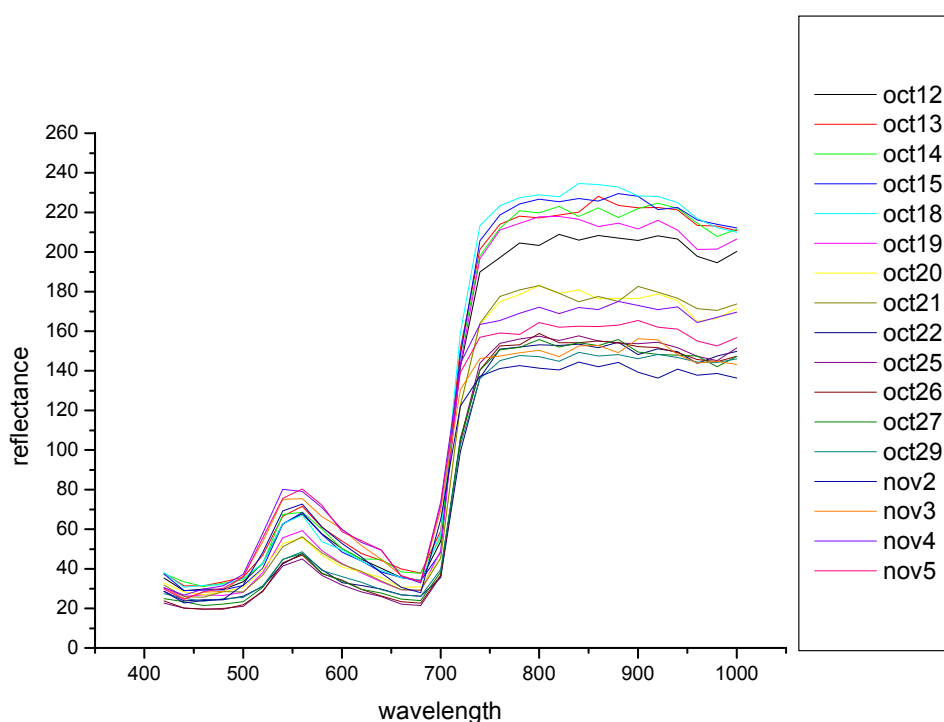
Αποτελέσματα

Παρακάτω παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα από την πειραματική διαδικασία. Αρχικά βλέπουμε τα φάσματα ανάκλασης των φυτών, τόσο των άγριων όσο και των γενετικά τροποποιημένων και στις δύο καταστάσεις καταπόνησης.

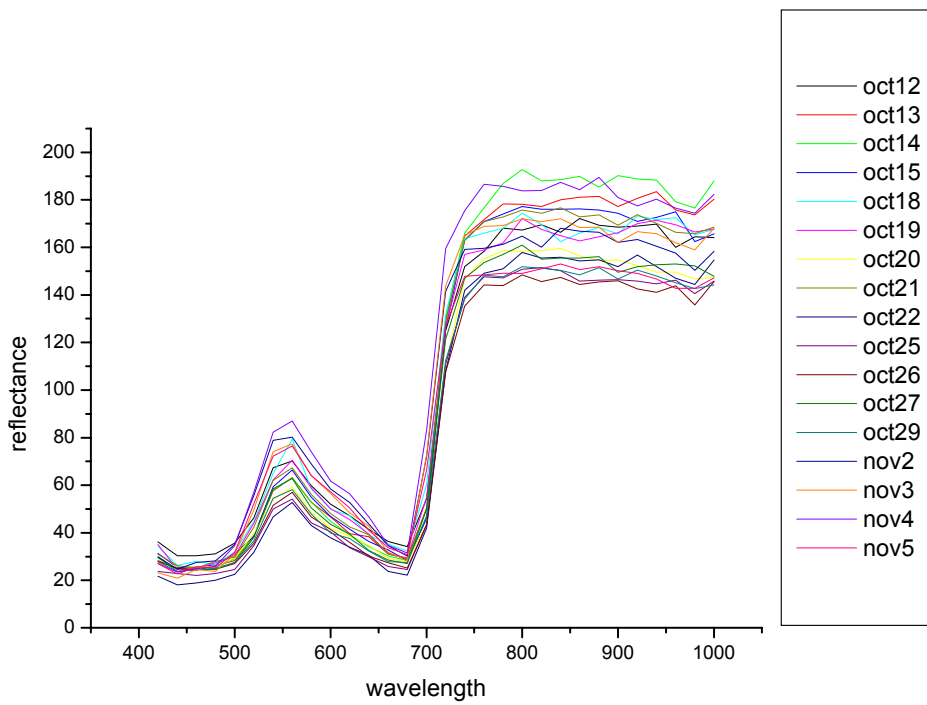
Παρακάτω παρουσιάζουμε τα διαγράμματα εξέλιξης της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και της αναλογίας καροτενοειδών-χλωροφύλλης στο χρόνο. Τα διαγράμματα αυτά προέκυψαν ύστερα από στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, τα οποία τα πήραμε από τις χαρτογραφημένες εικόνες, σε μια συγκεκριμένη περιοχή του φύλλου.

Τέλος παρουσιάζουμε τις χαρτογραφημένες εικόνες στις οποίες φαίνονται πιο καθαρά οι διαδικασίες αποδόμησης της χλωροφύλλης και ανιχνεύουμε υποκλινικές καταστάσεις διαγνωστικής σημασίας.

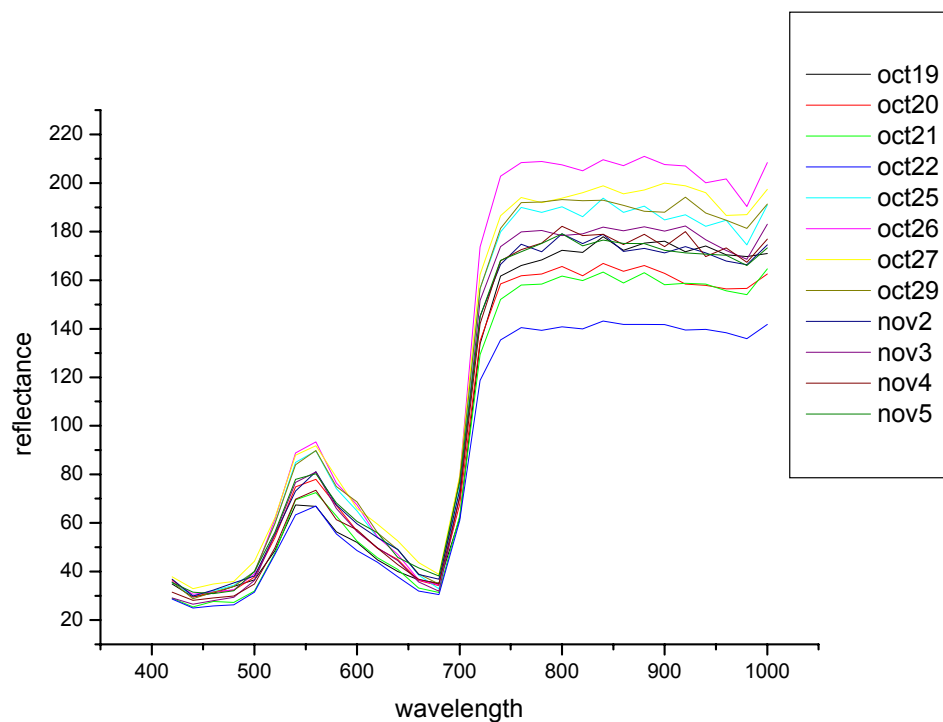
Φάσματα ανάκλασης(reflectance spectra)



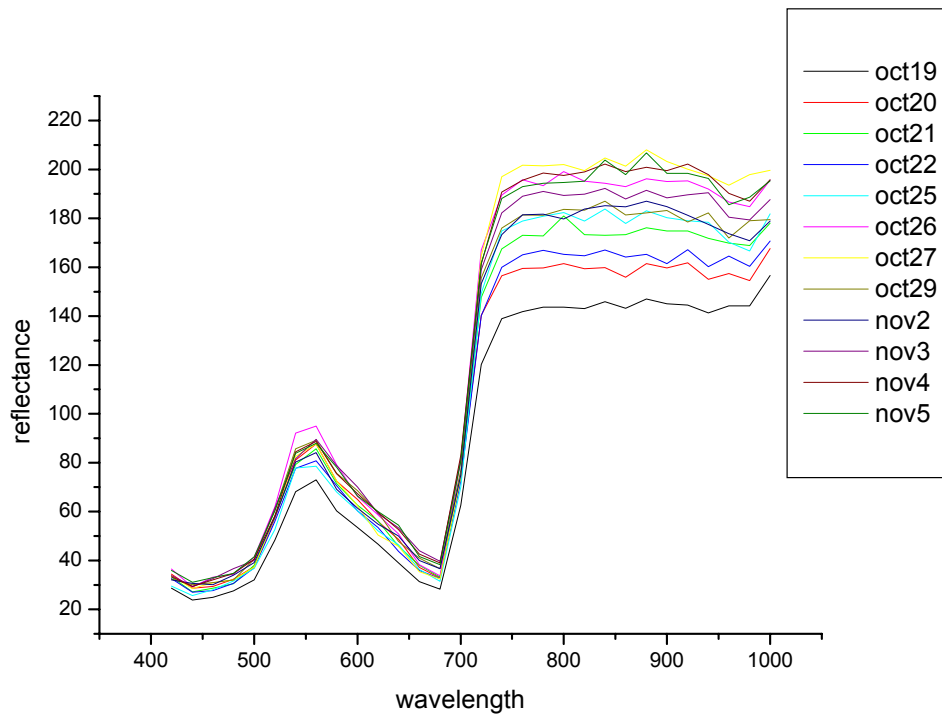
Φάσματα από 12 Οκτώβρη μέχρι 5 Νοέμβρη από άγρια(control) φυτά.



Φάσματα από 12 Οκτώβρη μέχρι 5 Νοέμβρη από γενετικά τροποποιημένα (transgenic) φυτά.

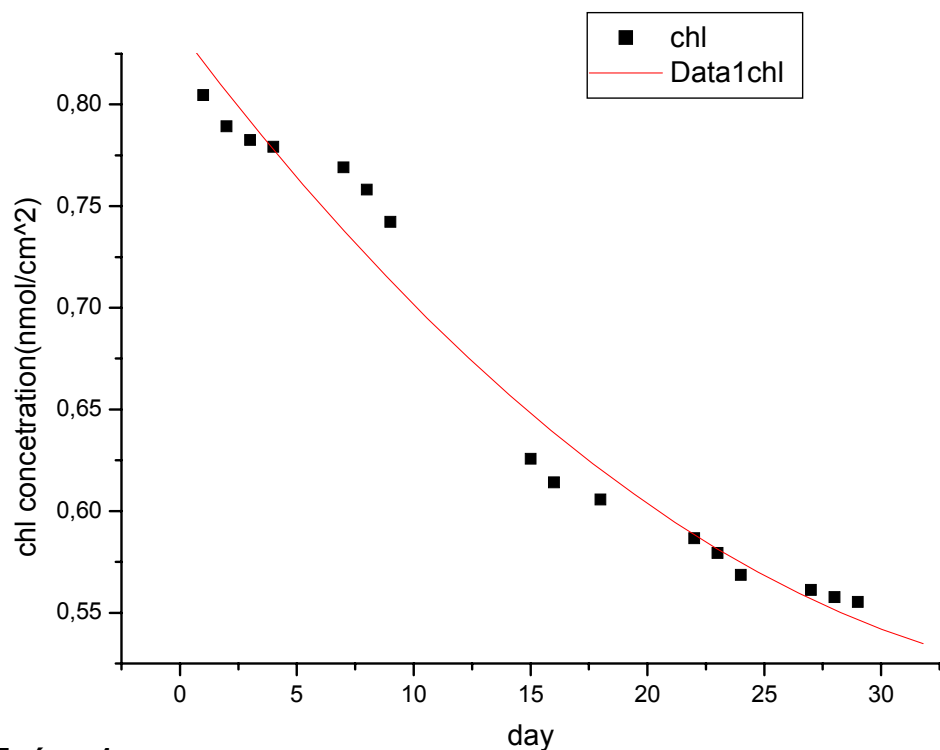


Φάσματα από 19 Οκτώβρη μέχρι 5 Νοέμβρη από άγρια(control) φυτά, που ποτίζονται με μίγμα καδμίου(Cd).



Φάσματα από 19 Οκτώβρη μέχρι 5 Νοέμβρη από άγρια(control) φυτά, που ποτίζονται με μίγμα καδμίου(Cd).

Άγρια φυτά (12 Οκτώβρη με 10 Νοέμβρη)



Σχήμα 1.

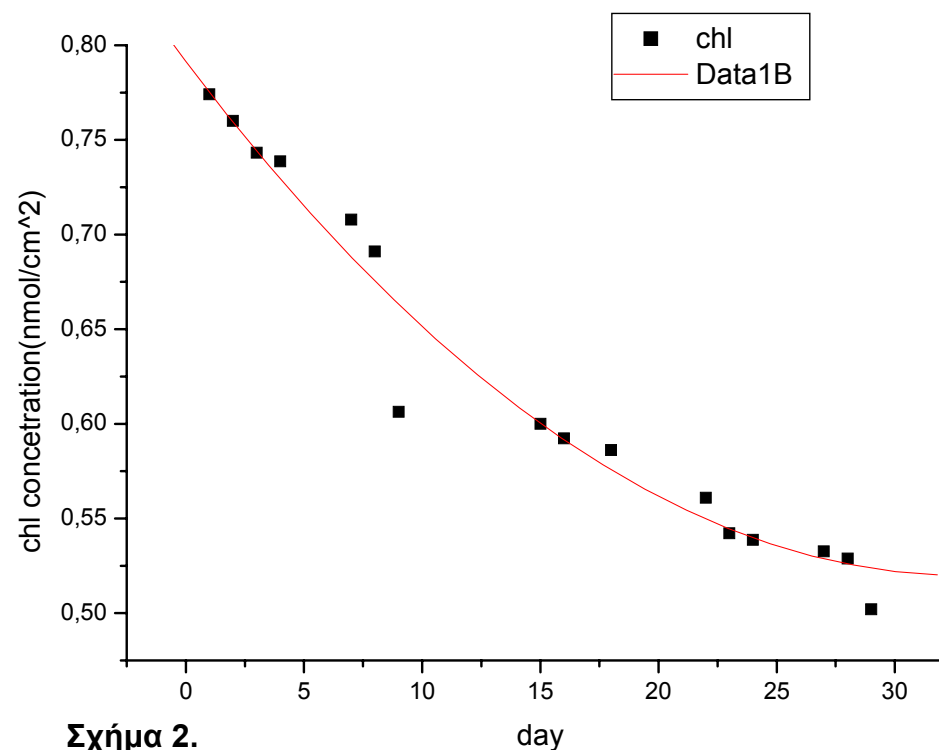
Polynomial Regression for DATA1_CHL:

$$Y = A + B1 \cdot X + B2 \cdot X^2$$

Parameter	Value	Error
A	0,83592	0,01292
B1	-0,01525	0,00223
B2	1,8169E-4	7,31051E-5

R-Square(COD) = 0,96719

Γενετικά τροποποιημένα (12 Οκτώβρη με 10 Νοέμβρη)



Σχήμα 2.

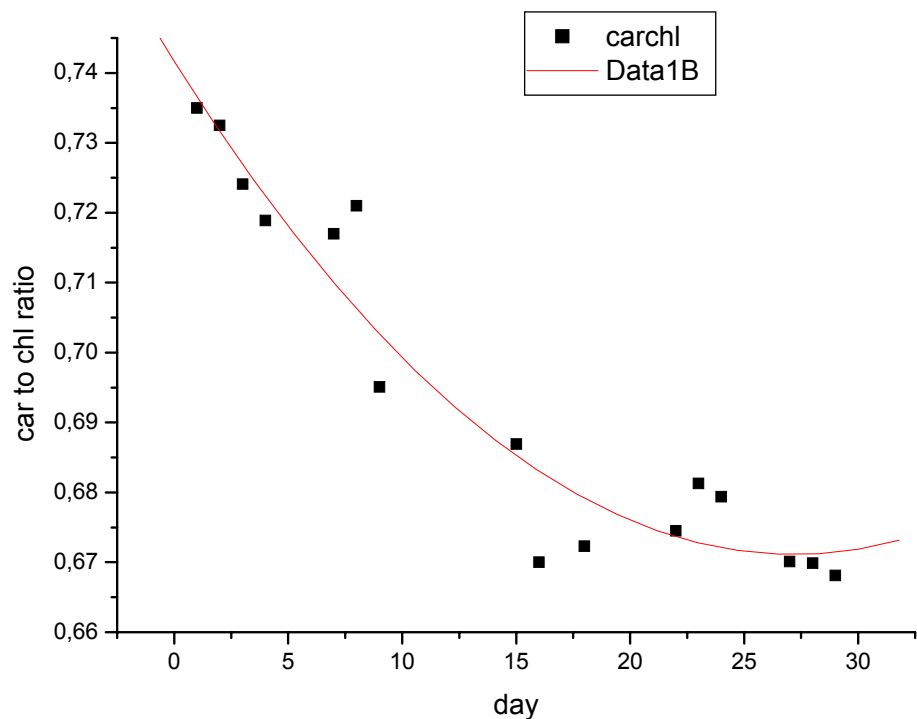
Polynomial Regression for DATA1_B:

$$Y = A + B1 \cdot X + B2 \cdot X^2$$

Parameter	Value	Error
A	0,79146	0,01208
B1	-0,01651	0,00209
B2	2,50924E-4	6,83645E-5

R-Square(COD) = 0,96673

Άγρια φυτά (12 Οκτώβρη με 10 Νοέμβρη)



Σχήμα 3.

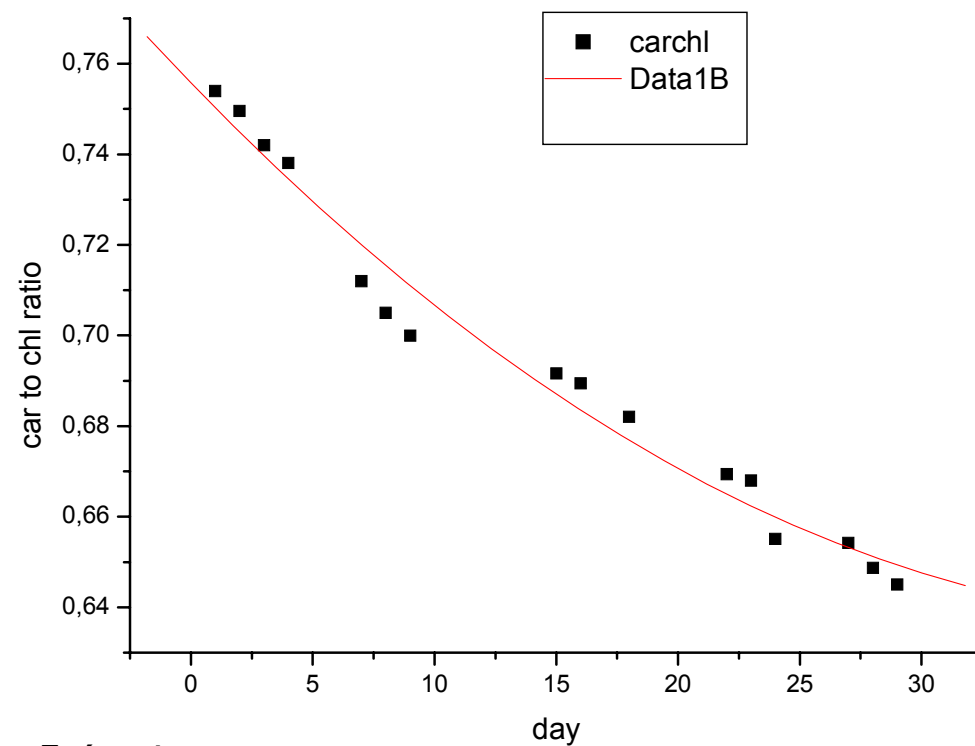
Polynomial Regression for DATA1_B:

$$Y = A + B1*X + B2*X^2$$

Parameter	Value	Error
A	0,74165	0,00487
B1	-0,00519	8,41021E-4
B2	9,55205E-5	2,75571E-5

R-Square(COD) = 0,92632

Γενετικά τροποποιημένα (12 Οκτώβρη με 10 Νοέμβρη)



Σχήμα 4.

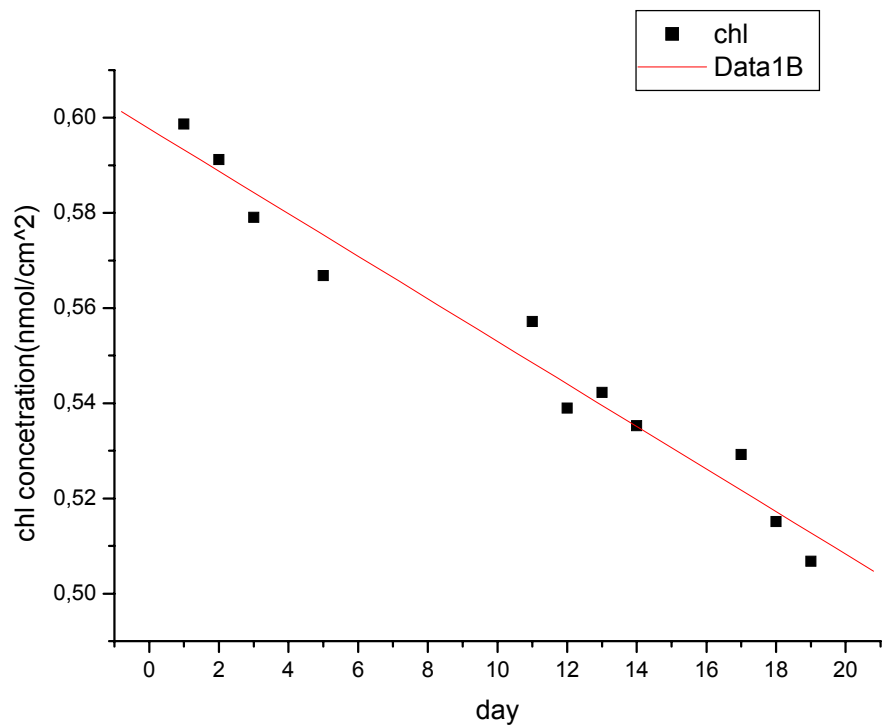
Polynomial Regression for DATA1_CARCHL:

$$Y = A + B1*X + B2*X^2$$

Parameter	Value	Error
A	0,75577	0,00422
B1	-0,00556	7,28657E-4
B2	6,50402E-5	2,38753E-5

R-Square(COD) = 0,97396

Άγρια φυτά(20 Οκτώβρη - 10 Νοέμβρη), πότισμα με κάδμιο(Cd)



Σχήμα 5.

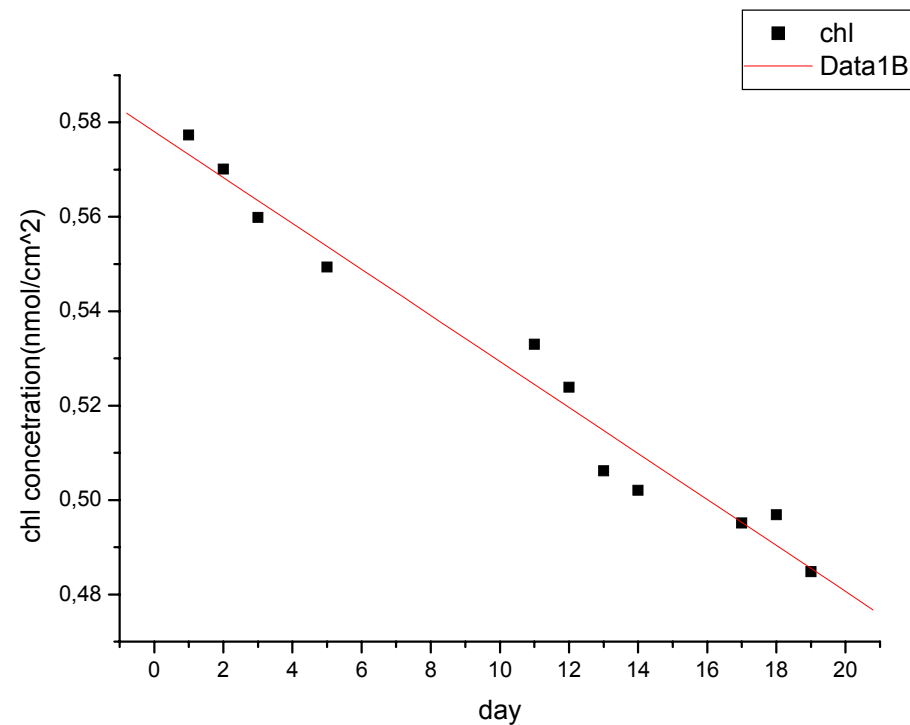
Linear Regression for Data1_B:

$Y = A + B * X$

Parameter	Value	Error
A	0,59771	0,00358
B	-0,00447	2,92798E-4

$R = -0,98124$

Γενετικά τροποποιημένα φυτά(20 Οκτώβρη - 10 Νοέμβρη), πότισμα με κάδμιο(Cd)



Σχήμα 6.

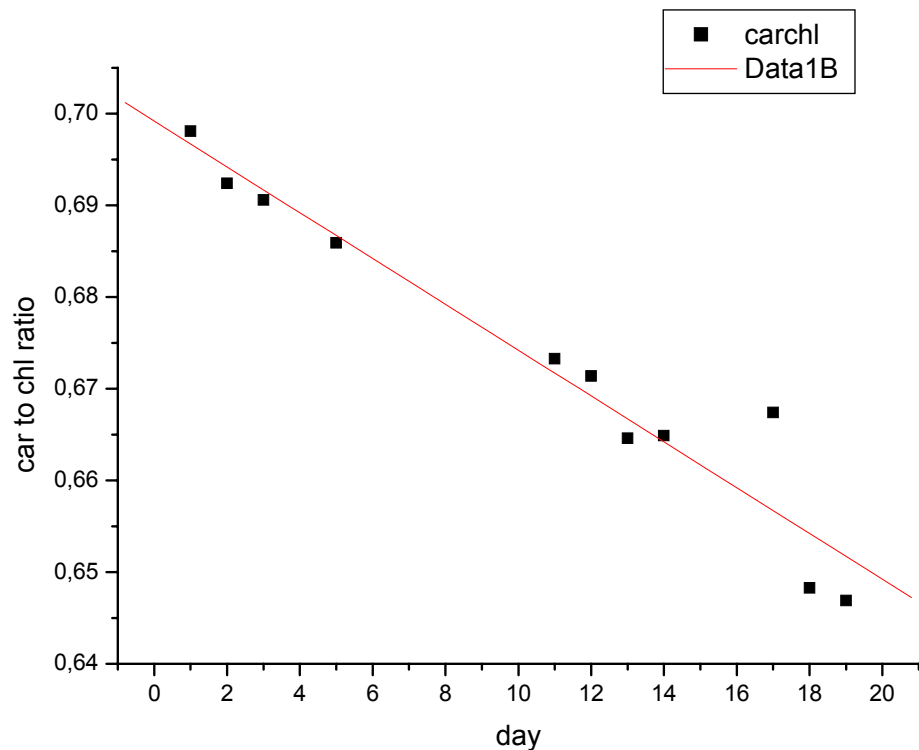
Linear Regression for Data1_B:

$Y = A + B * X$

Parameter	Value	Error
A	0,57808	0,00346
B	-0,00487	2,83331E-4

$R = -0,98511$

Άγρια φυτά(20Οκτώβρη-10 Νοέμβρη), πότισμα με κάδμιο(Cd)



Σχήμα 7.

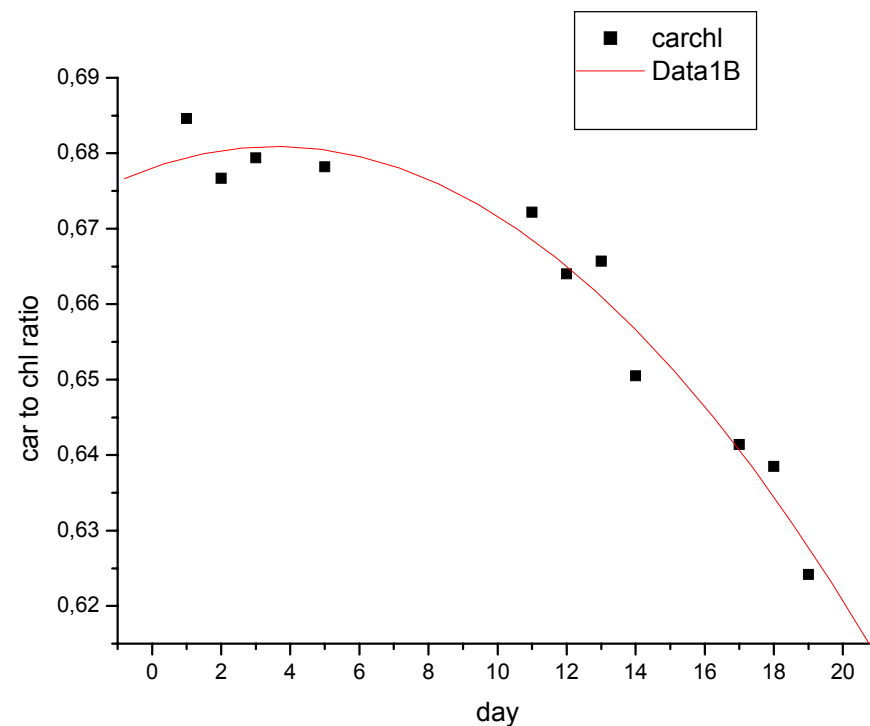
Linear Regression for Data1_B:

$Y = A + B * X$

Parameter	Value	Error
A	0,6992	0,00269
B	-0,0025	2,19833E-4

R = -0,9669

Γενετικά τροποποιημένα φυτά(20 Οκτώβρη - 10 Νοέμβρη), πότισμα με κάδμιο(Cd)



Σχήμα 8.

Polynomial Regression for DATA1_B:

$Y = A + B1*X + B2*X^2$

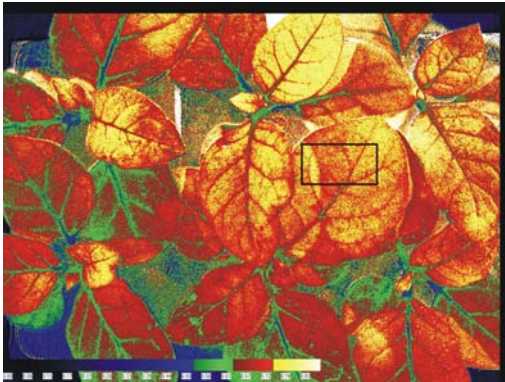
Parameter	Value	Error
A	0,67808	0,00353
B1	0,00159	9,07246E-4
B2	-2,22849E-4	4,53367E-5

R-Square(COD) = 0,96194

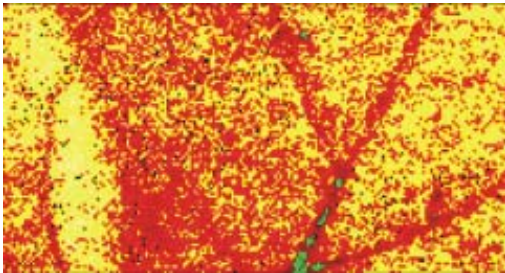
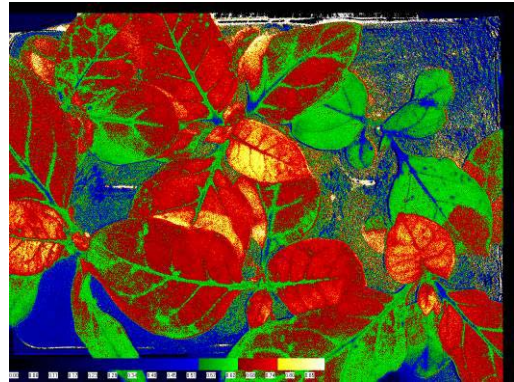
Άγρια (control)



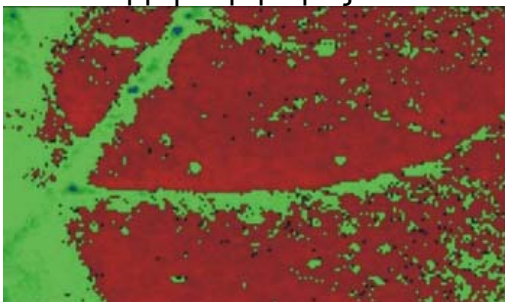
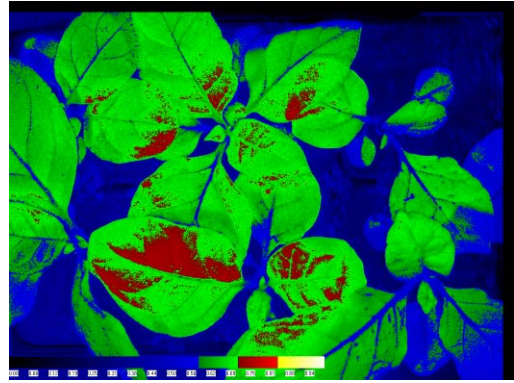
Γενετικά τροποποιημένα



12 Οκτώβρη αλγοριθμός1

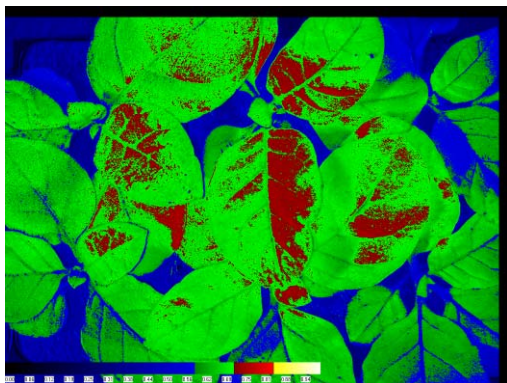
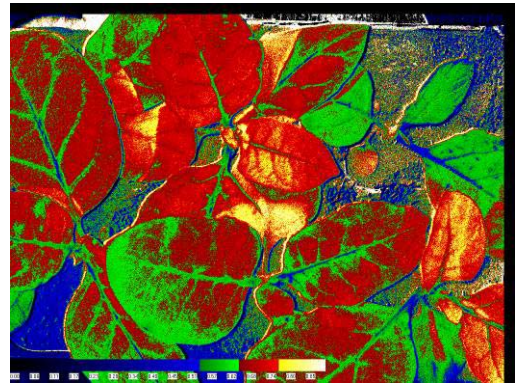


12 Οκτώβρη αλγοριθμος2



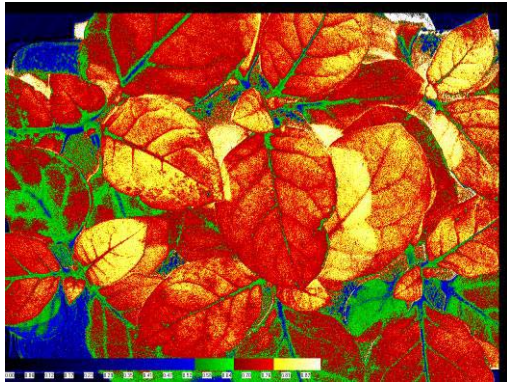


13 Οκτώβρη αλγοριθμος1

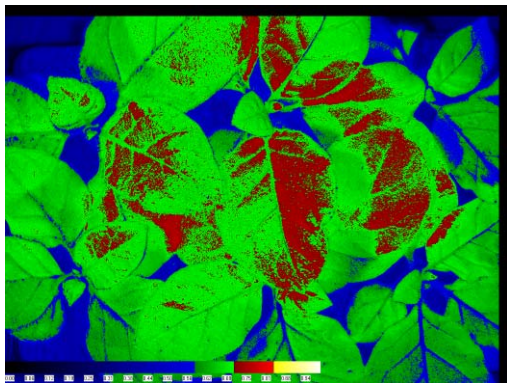
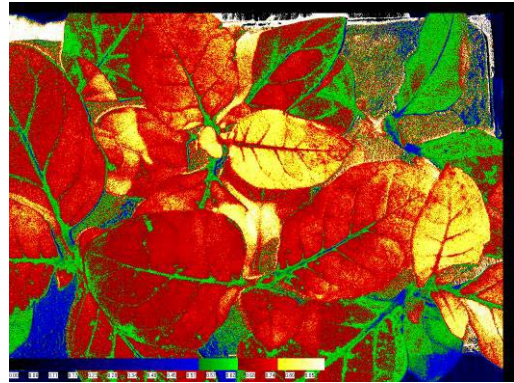


13 Οκτώβρη αλγοριθμος2

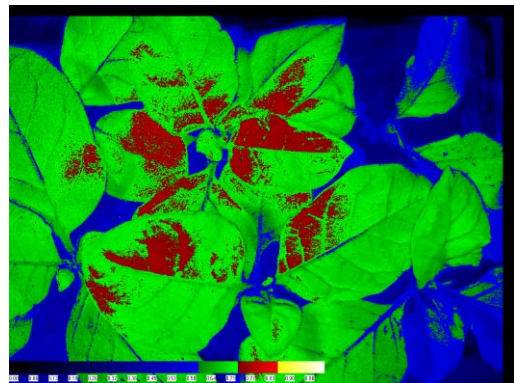


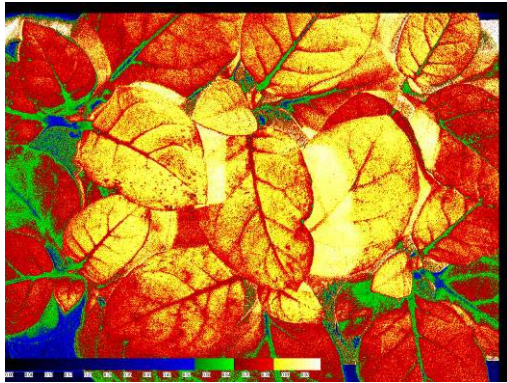


14 Οκτώβρη αλγοριθμος1

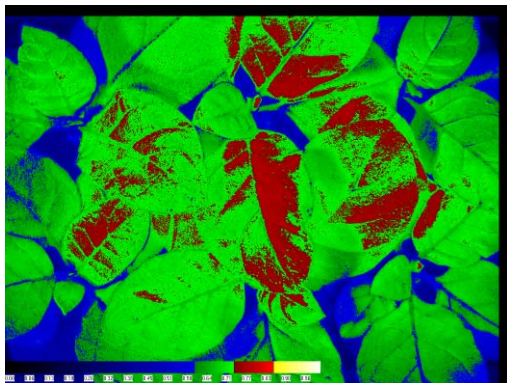
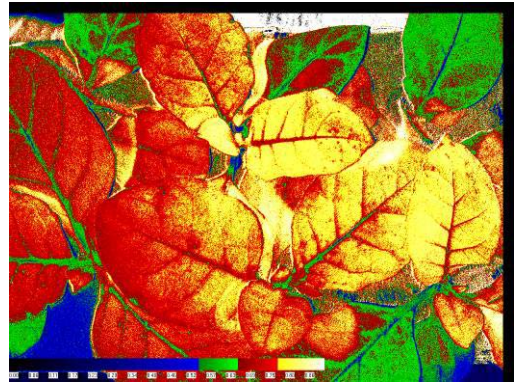


14 Οκτώβρη αλγοριθμος2

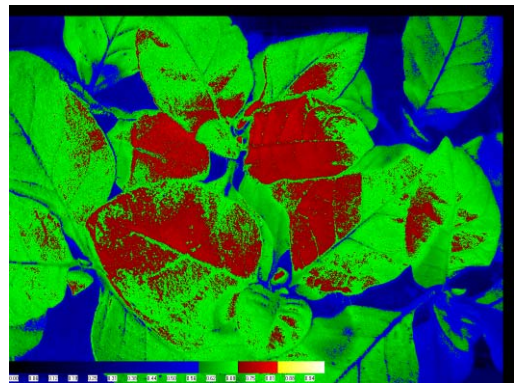


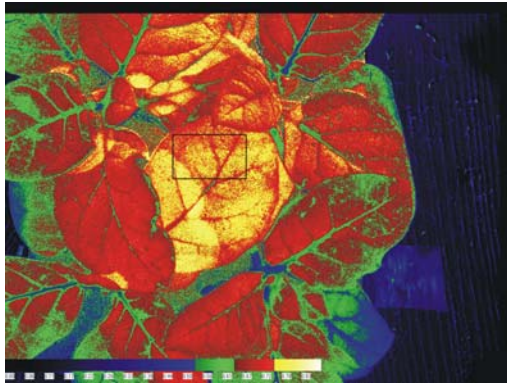
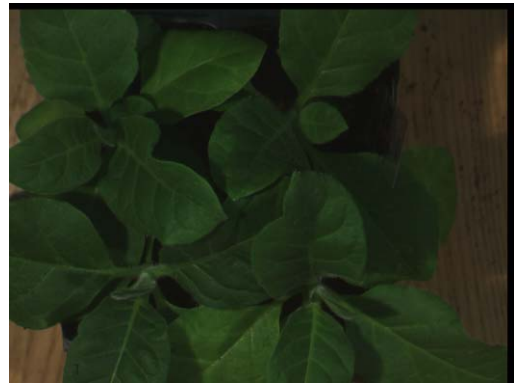


15 Οκτώβρη αλγοριθμος1

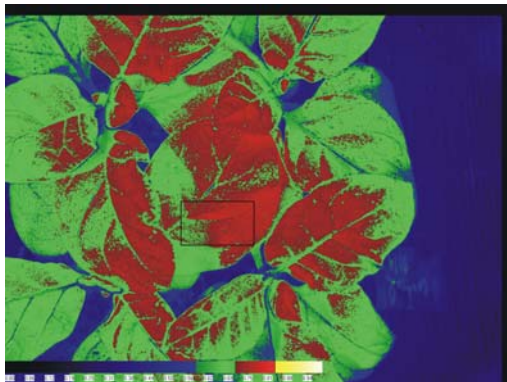
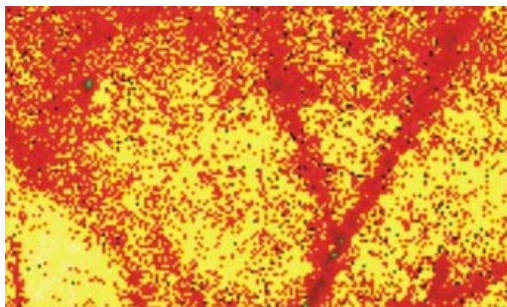
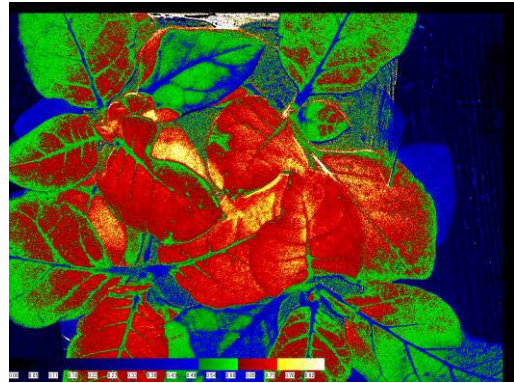


15 Οκτώβρη αλγοριθμος2

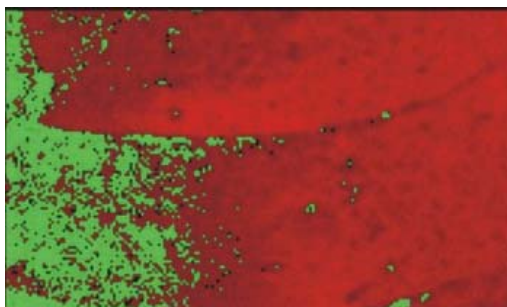
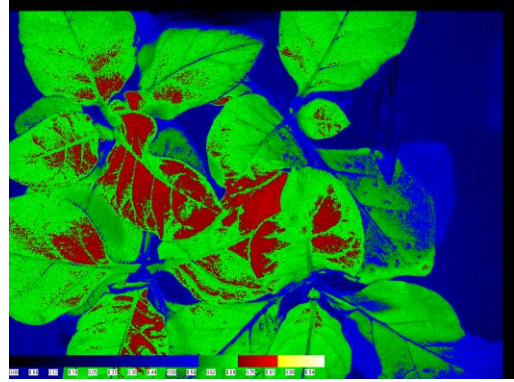


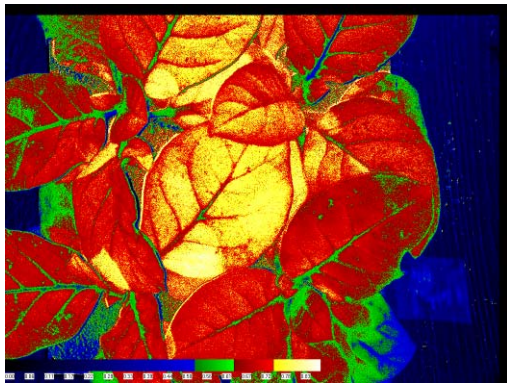
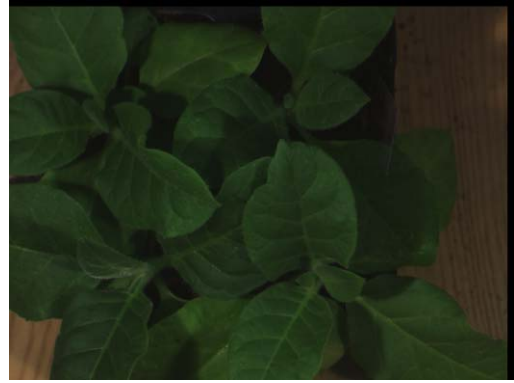


18 Οκτώβρη αλγοριθμος1

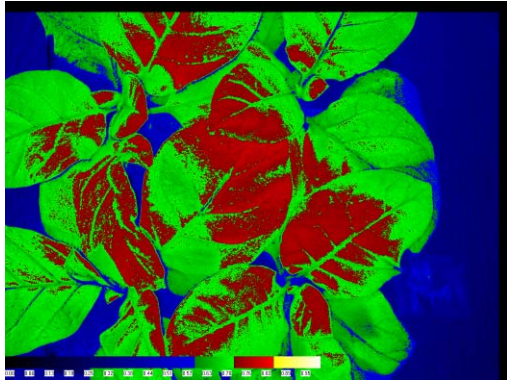
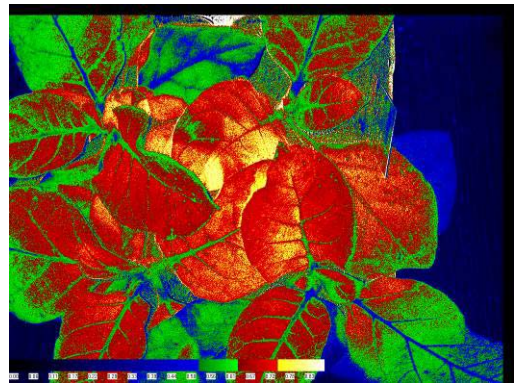


18 Οκτώβρη αλγοριθμος2

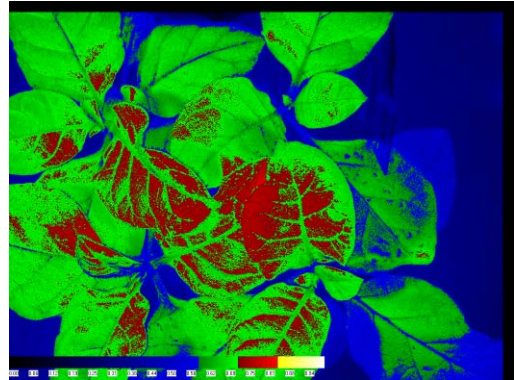


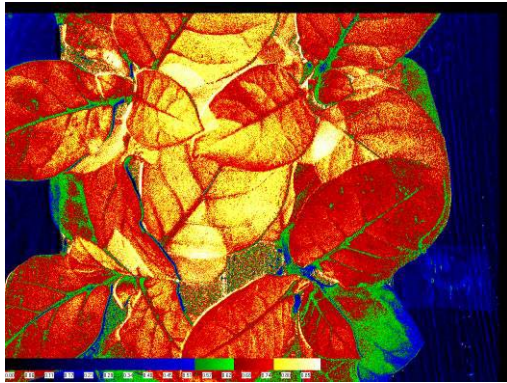
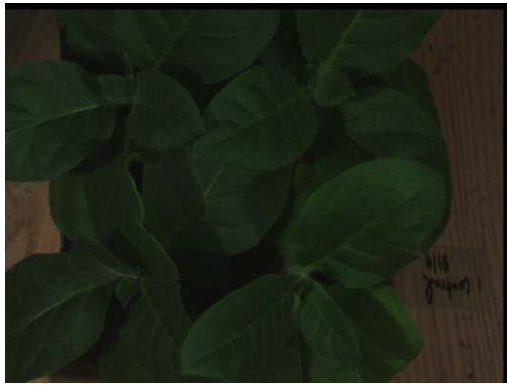


19 Οκτώβρη αλγοριθμος1

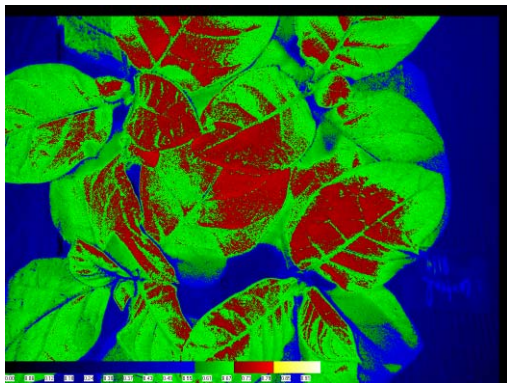
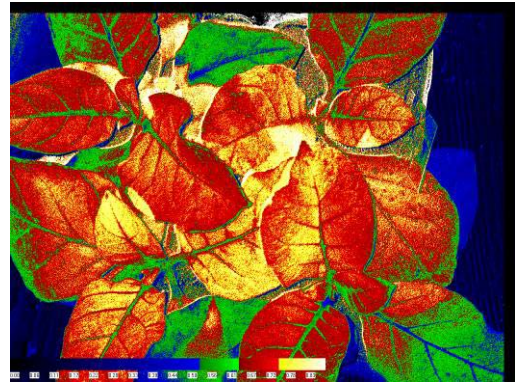


19 Οκτώβρη αλγοριθμος2

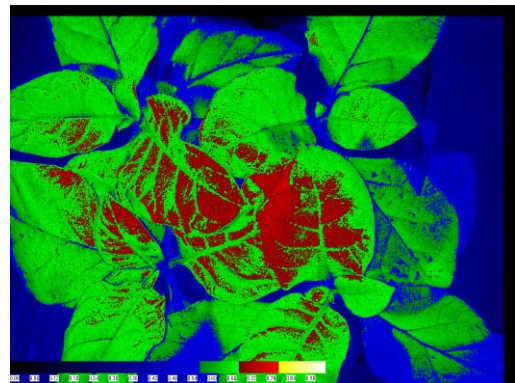


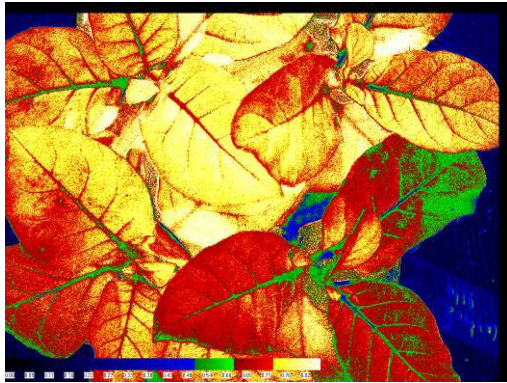
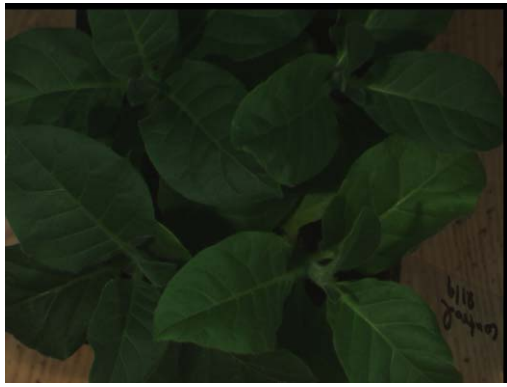


20 Οκτώβρη αλγοριθμος1

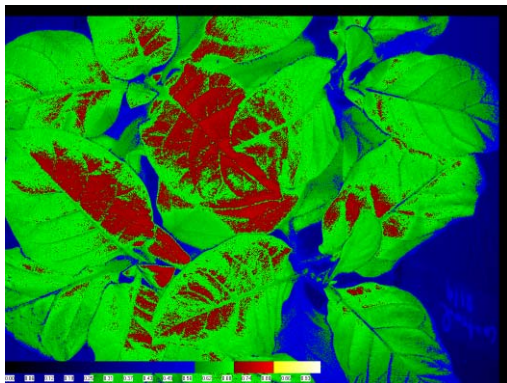
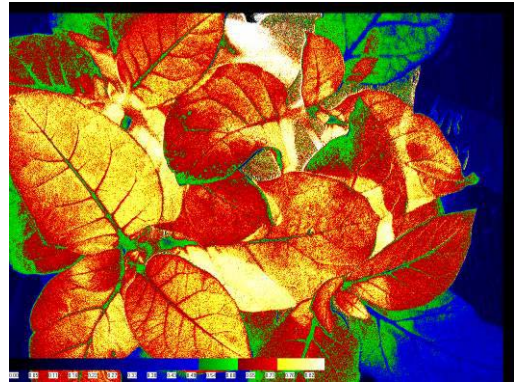


20 Οκτώβρη αλγοριθμος2

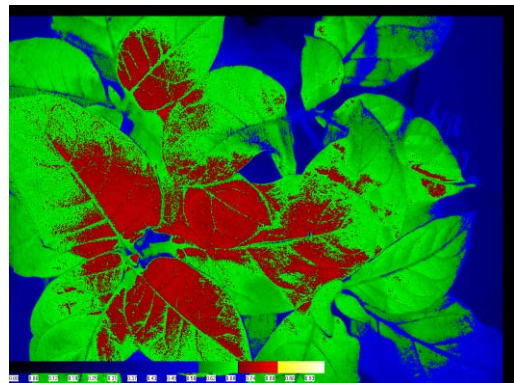


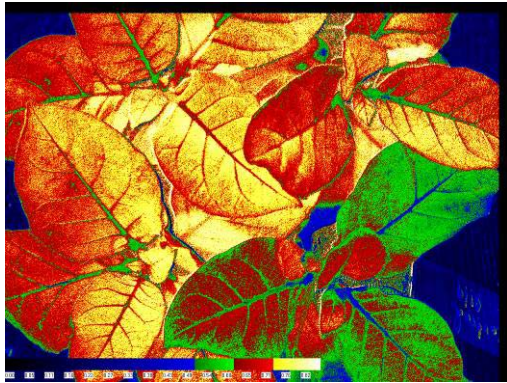
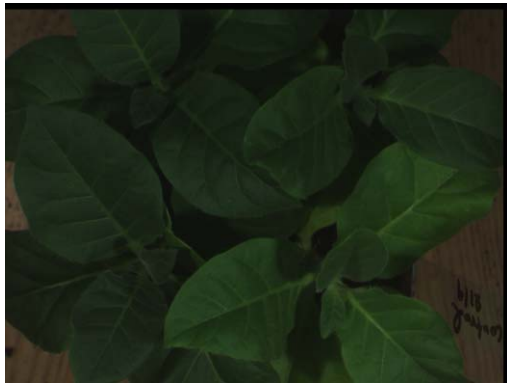


26 Οκτώβρη αλγοριθμος1

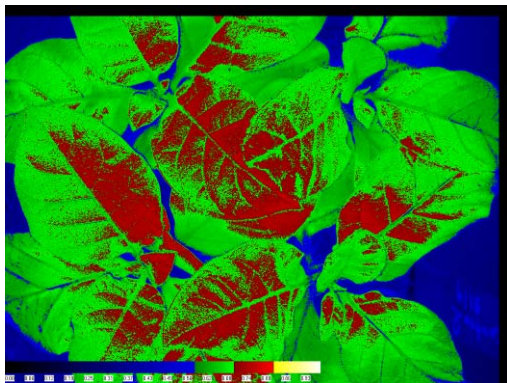
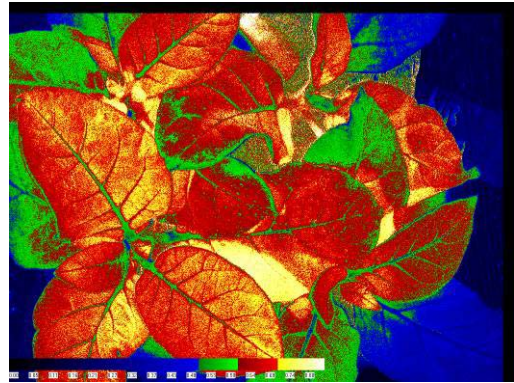


26 Οκτώβρη αλγοριθμος2



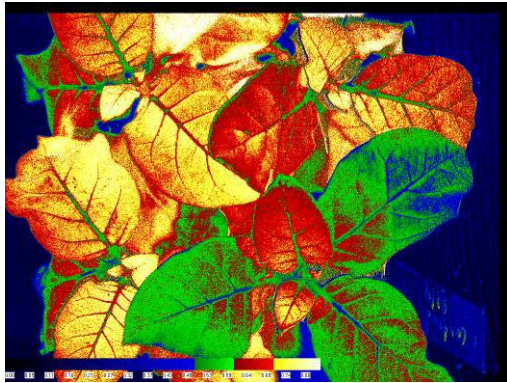


27 Οκτώβρη αλγοριθμος1

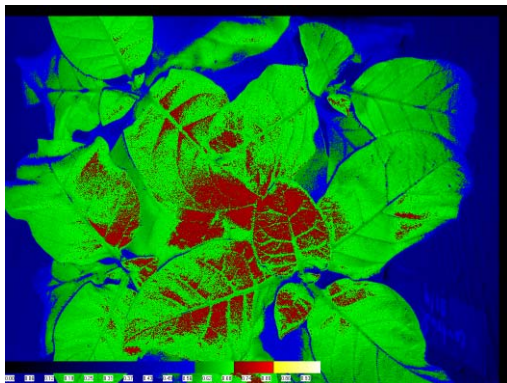
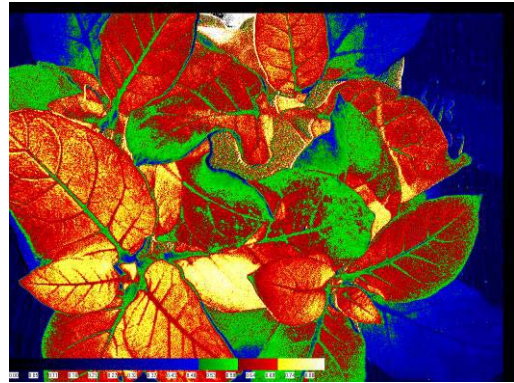


27 Οκτώβρη αλγοριθμος2

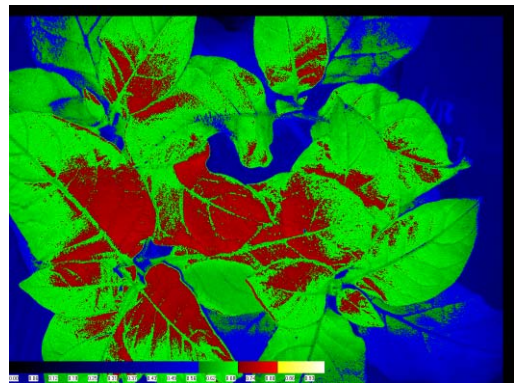


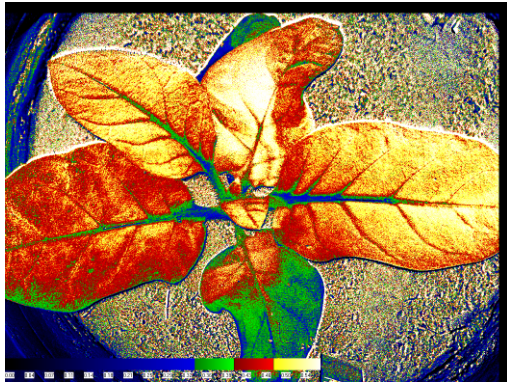


29 Οκτώβρη αλγοριθμος1

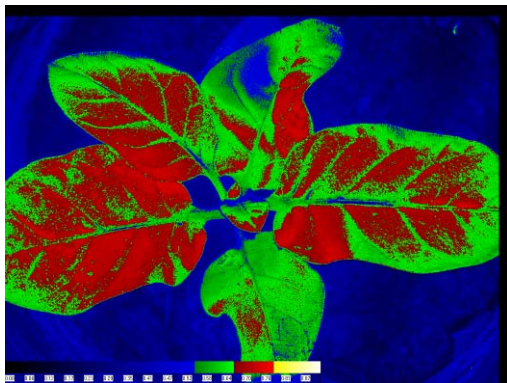
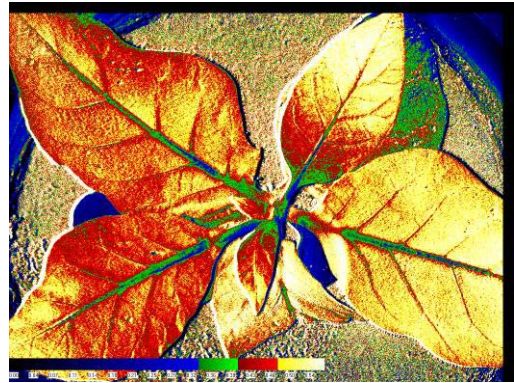


29 Οκτώβρη αλγοριθμος2

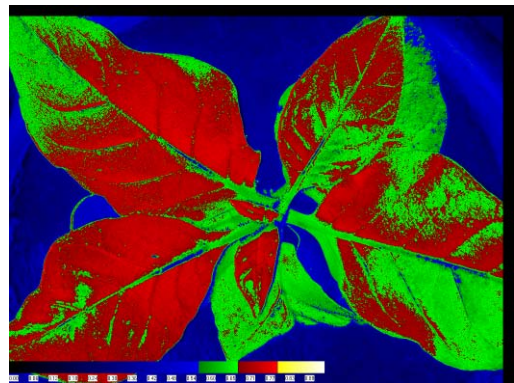


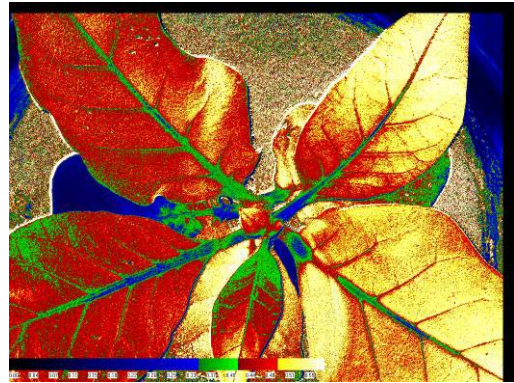
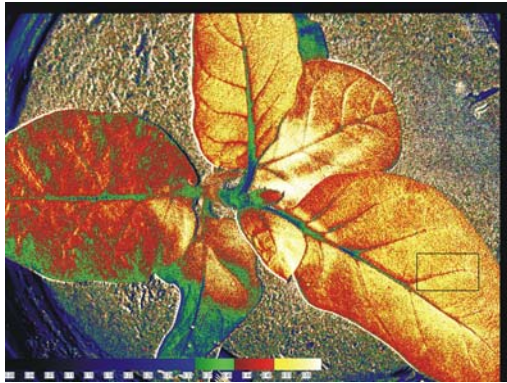


3 Νοέμβρη αλγοριθμος1

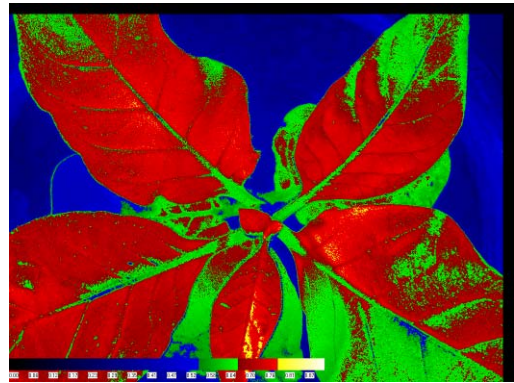
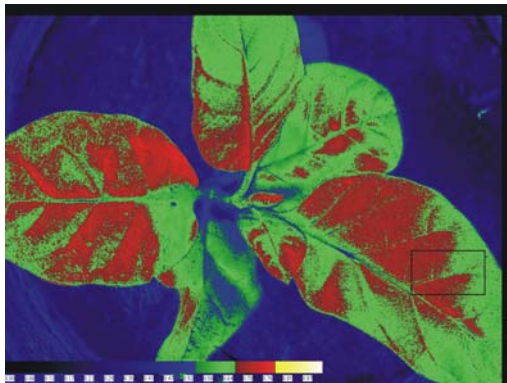
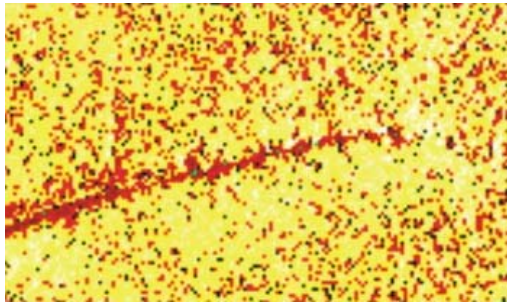


3 Νοέμβρη αλγοριθμος2

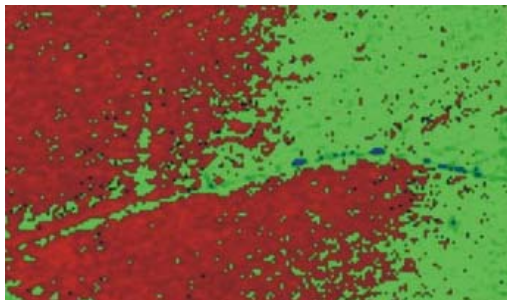


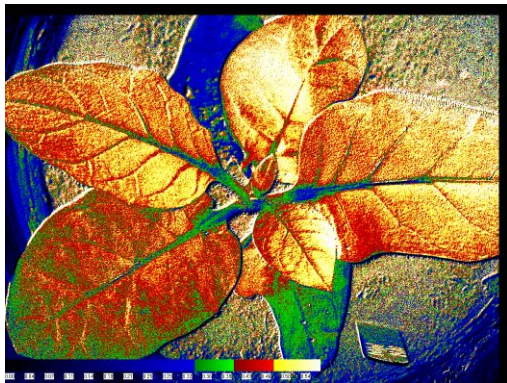


4 Νοέμβρη αλγοριθμος1

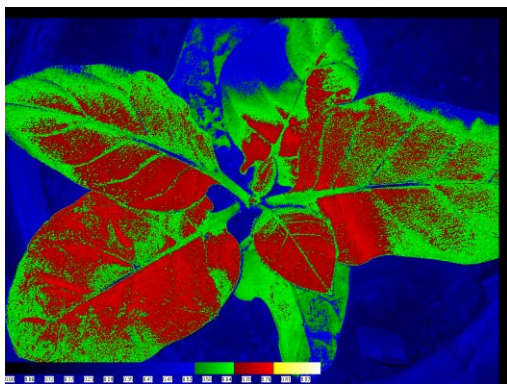
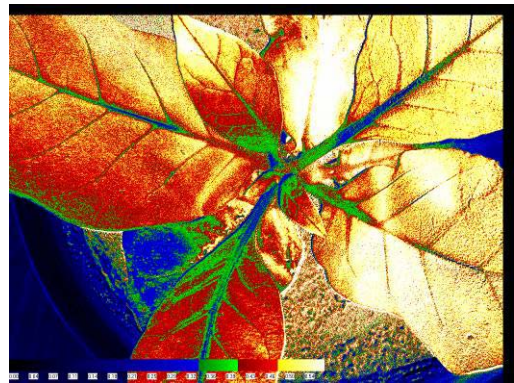


4 Νοέμβρη αλγοριθμος2

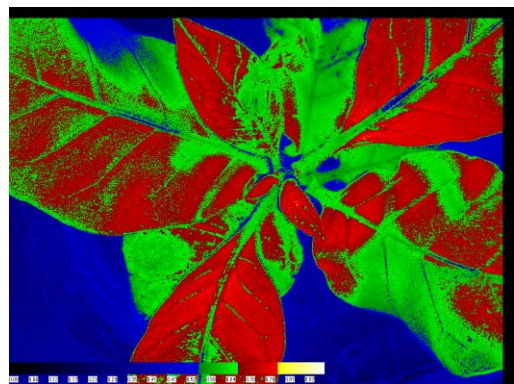


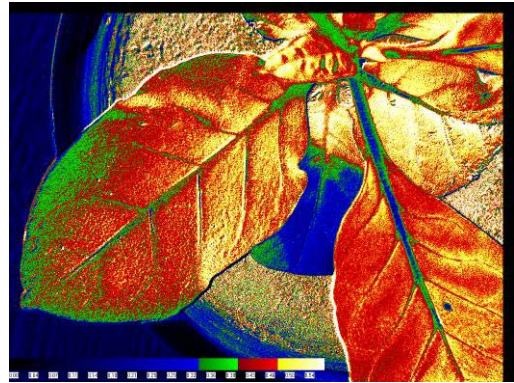


5 Νοέμβρη αλγοριθμος1

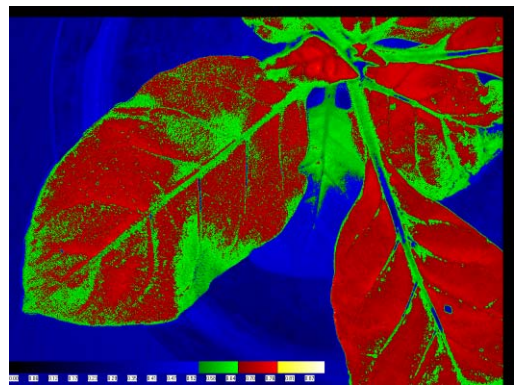
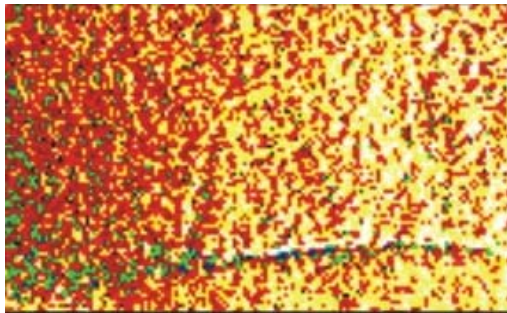


5 Νοέμβρη αλγοριθμος2

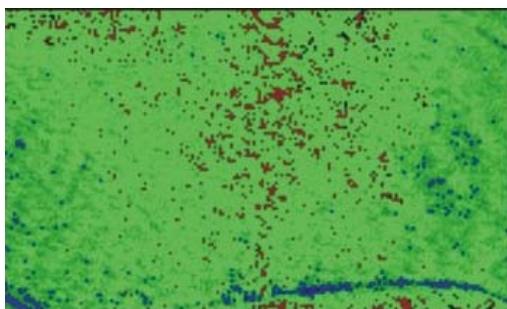


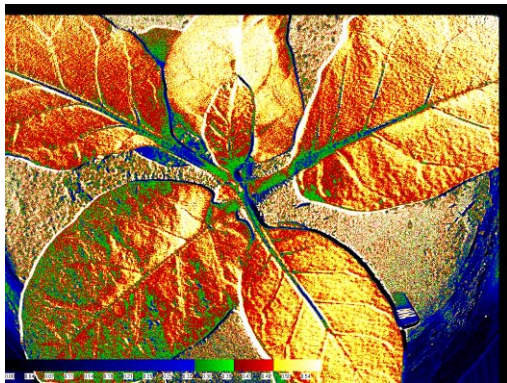


8 Νοέμβρη αλγοριθμος1

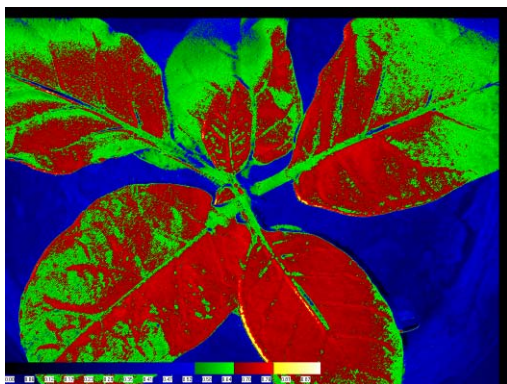
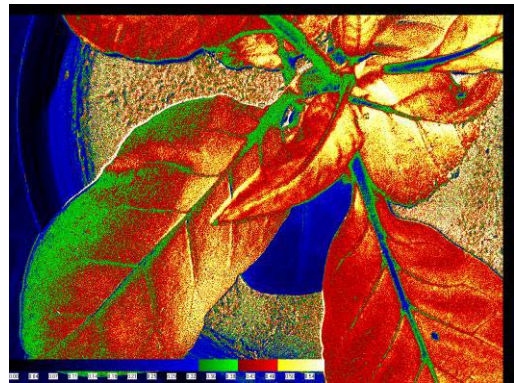


8 Νοέμβρη αλγοριθμος2

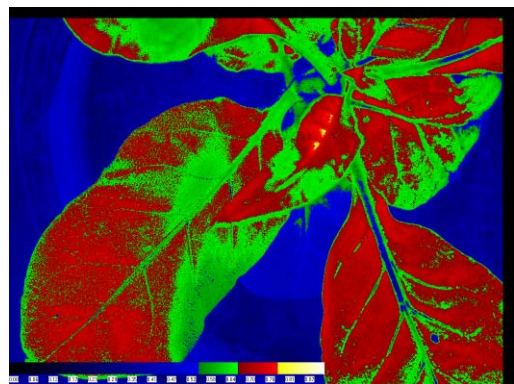


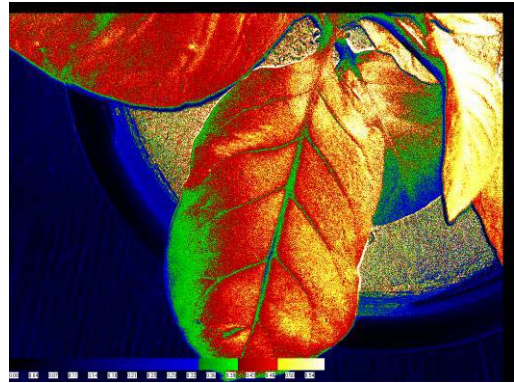


9 Νοέμβρη αλγοριθμος1

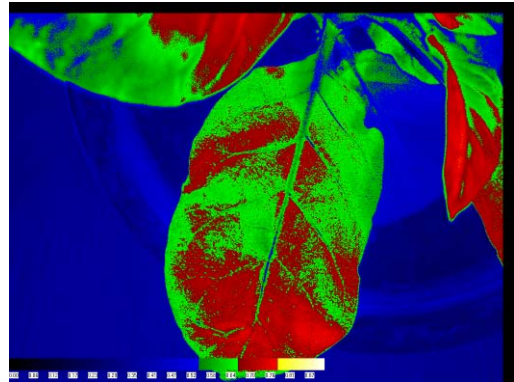
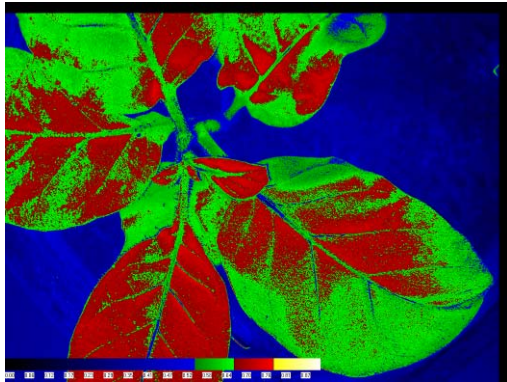


9 Νοέμβρη αλγοριθμος2





10 Νοέμβρη αλγοριθμος1



10 Νοέμβρη αλγοριθμος2

Πότισμα με μίγμα βαρέων μετάλλων (Cd)

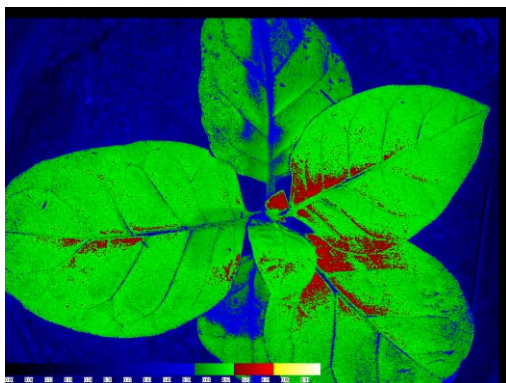
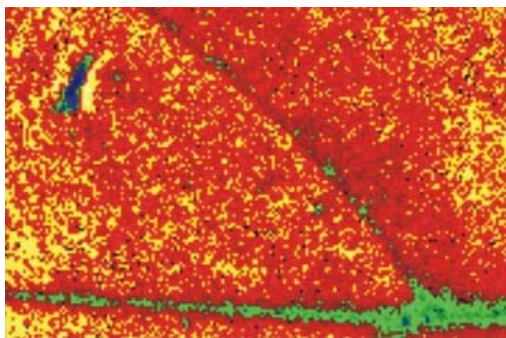
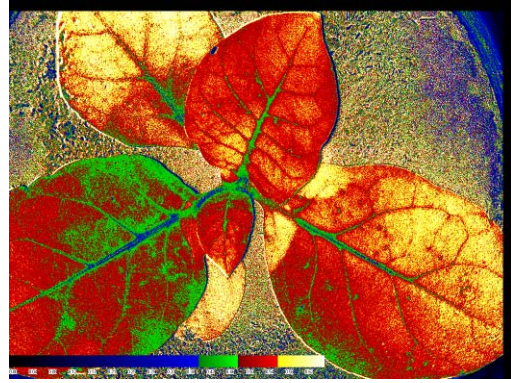
Άγρια (control)



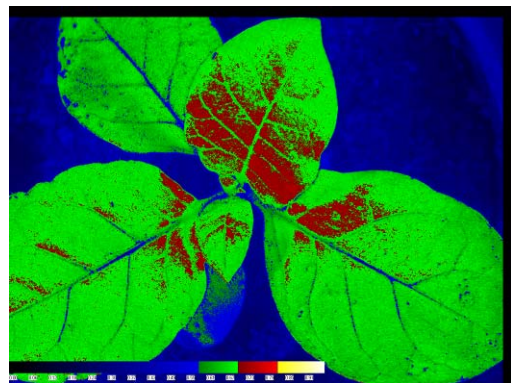
Γενετικά τροποποιημένα

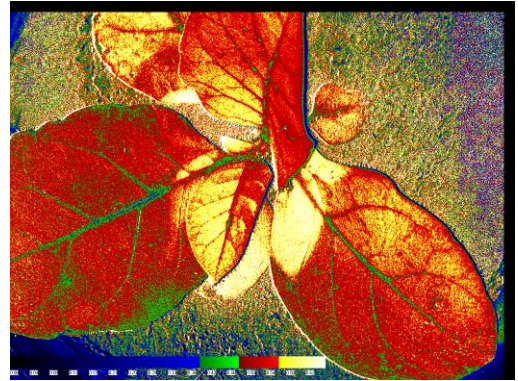
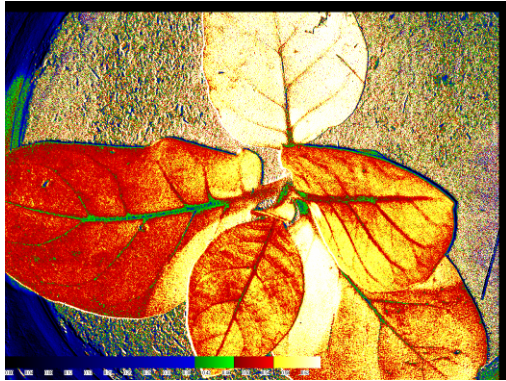


20 Οκτώβρη αλγόριθμος1

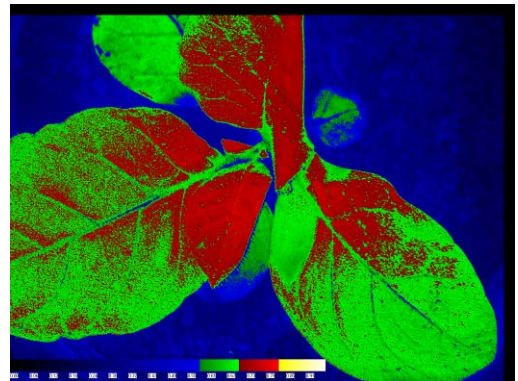
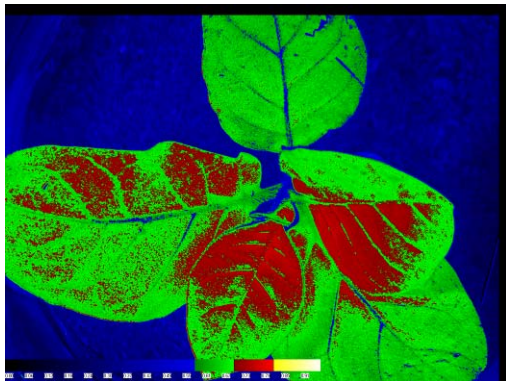


20 Οκτώβρη αλγόριθμος2

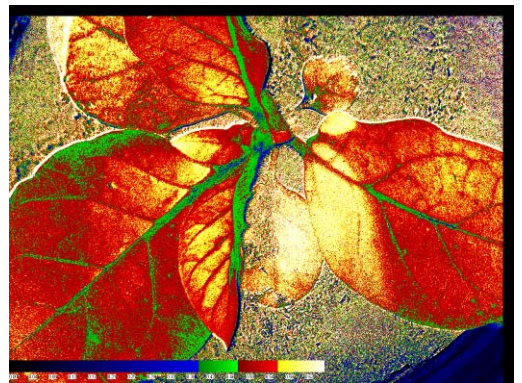




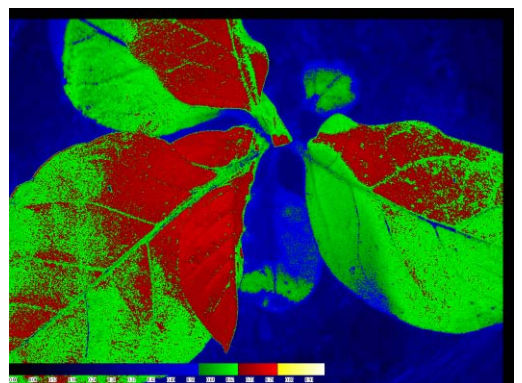
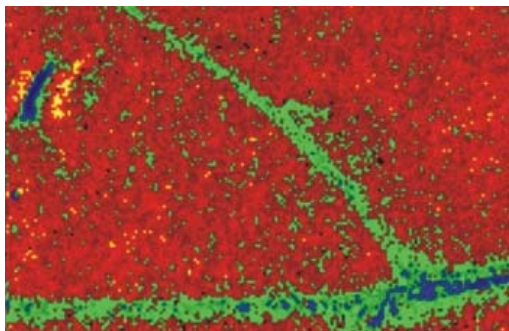
21 Οκτώβρη αλγόριθμος1



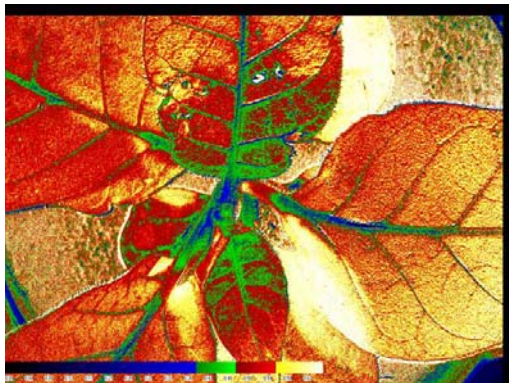
21 Οκτώβρη αλγόριθμος2



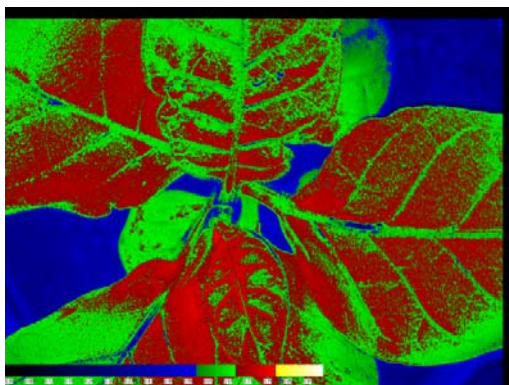
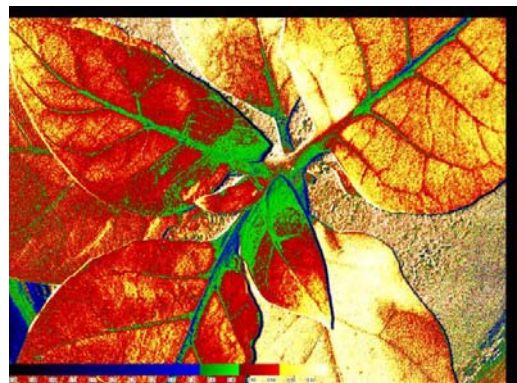
22 Οκτώβρη αλγόριθμος1



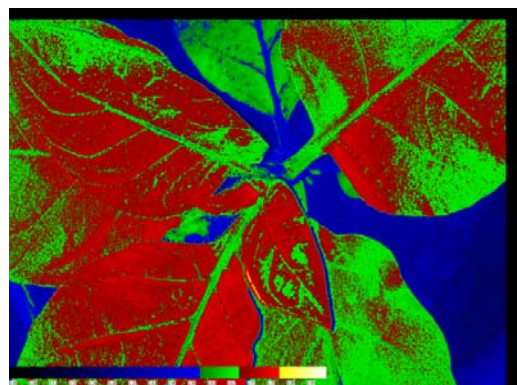
22 Οκτώβρη αλγόριθμος1

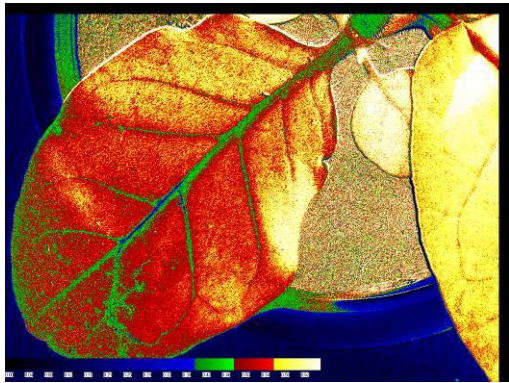


25 Οκτώβρη αλγόριθμος1

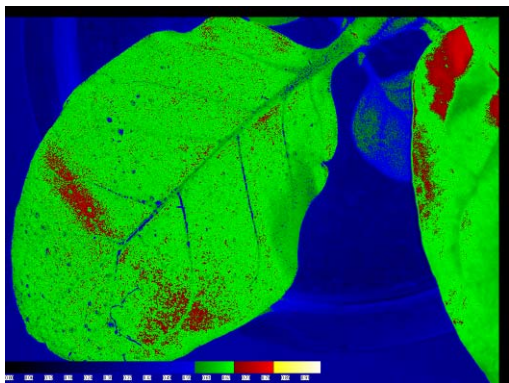
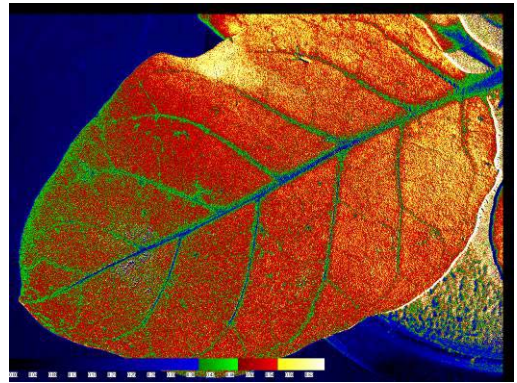


25 Οκτώβρη αλγόριθμος2

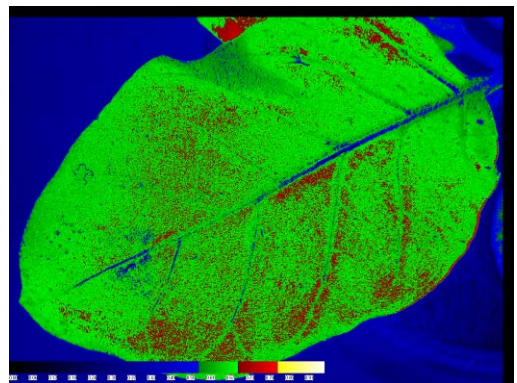


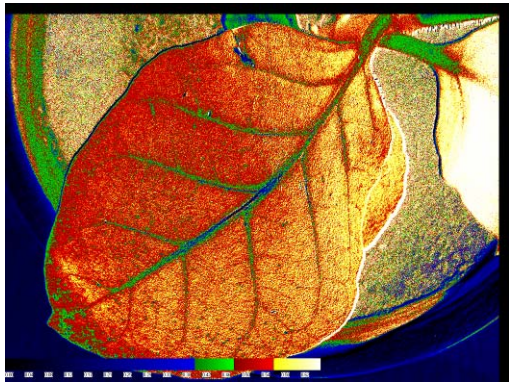


2 Νοέμβρη αλγόριθμος1

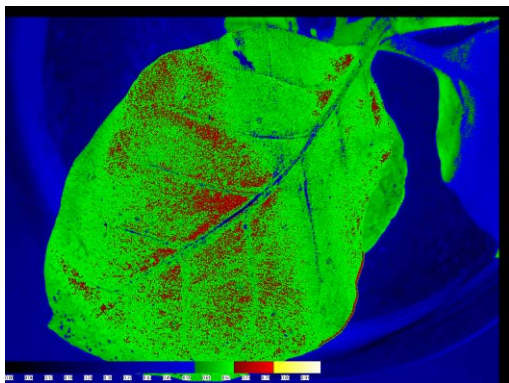
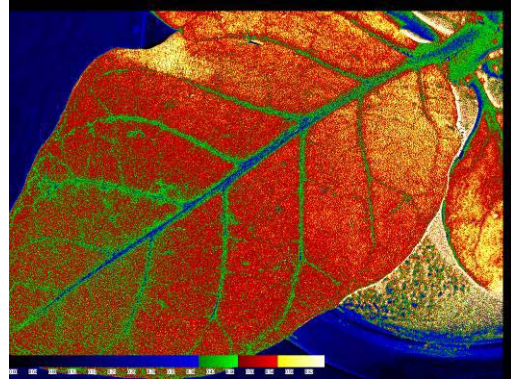


2 Νοέμβρη αλγόριθμος2

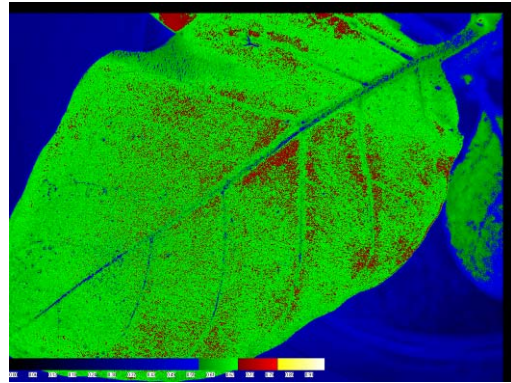


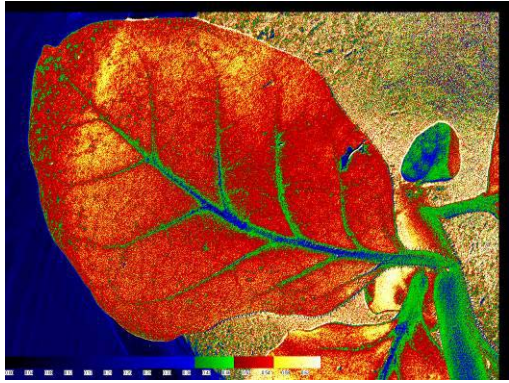


3 Νοέμβρη αλγόριθμος1

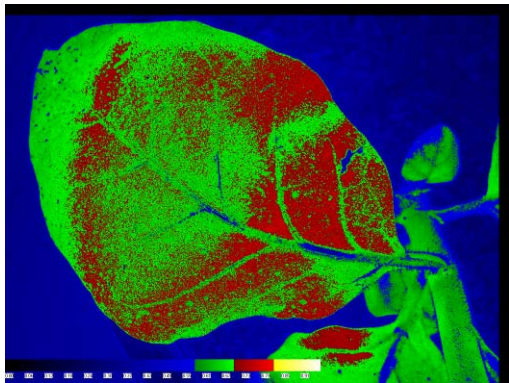
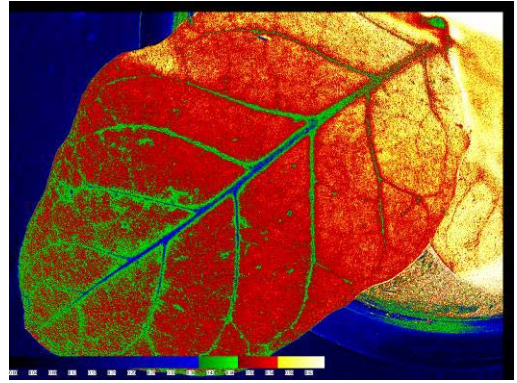


3 Νοέμβρη αλγόριθμος2

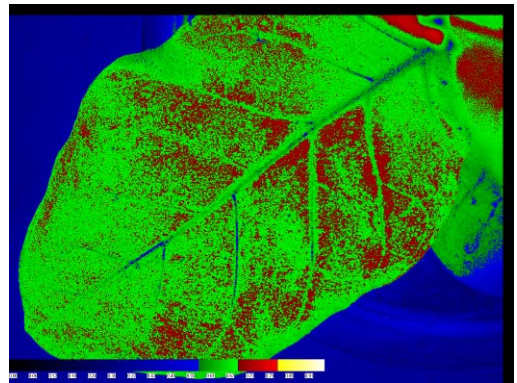


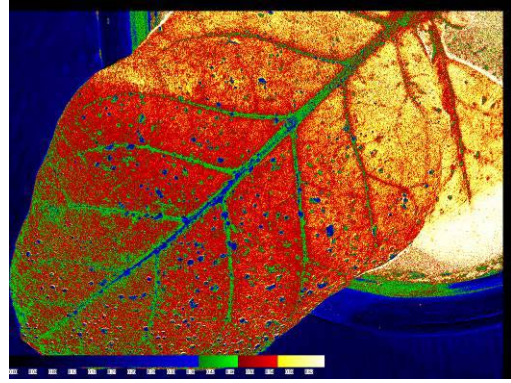
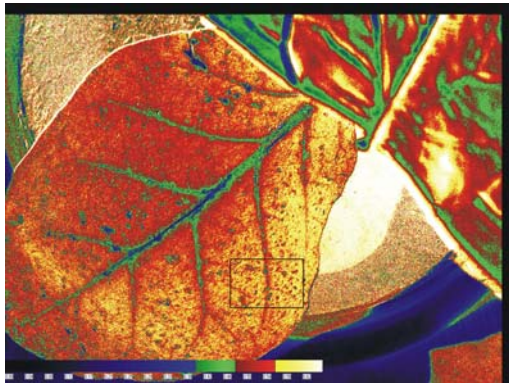


4 Νοέμβρη αλγόριθμος1

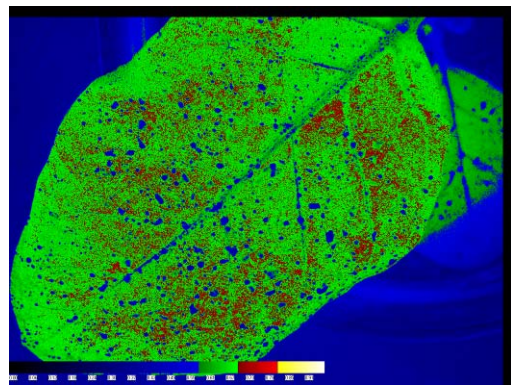
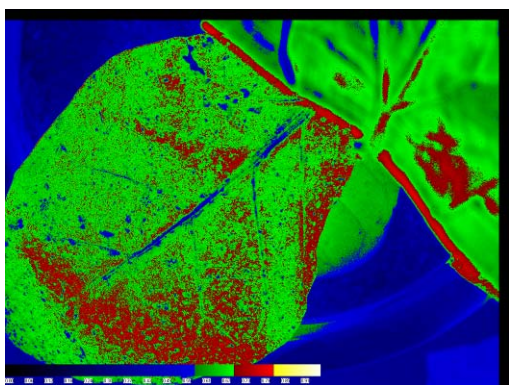
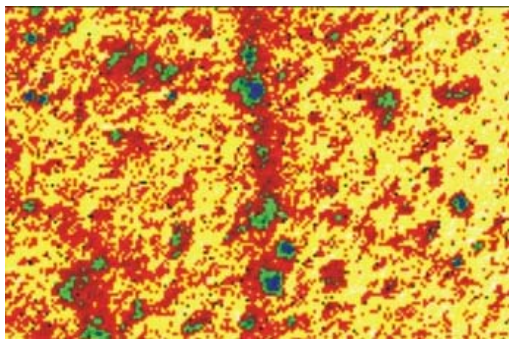


4 Νοέμβρη αλγόριθμος2

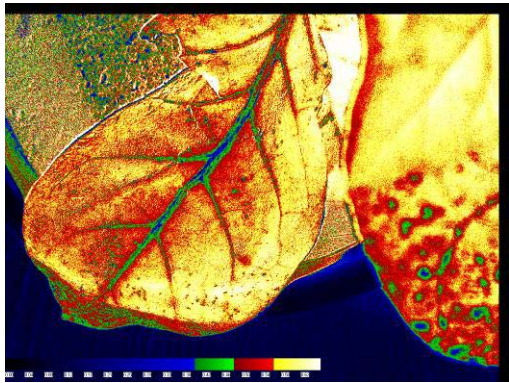




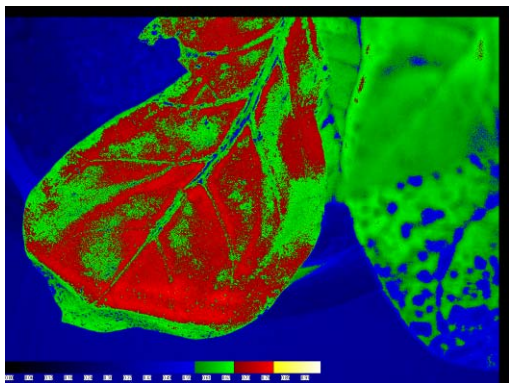
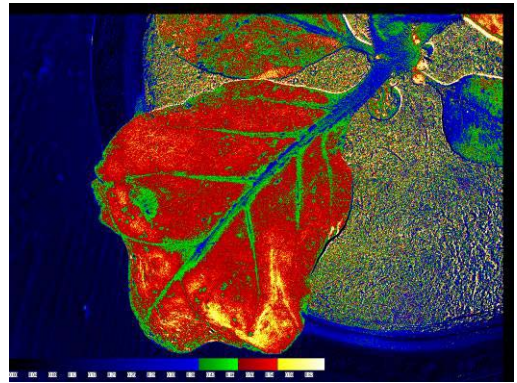
5 Νοέμβρη αλγόριθμος1



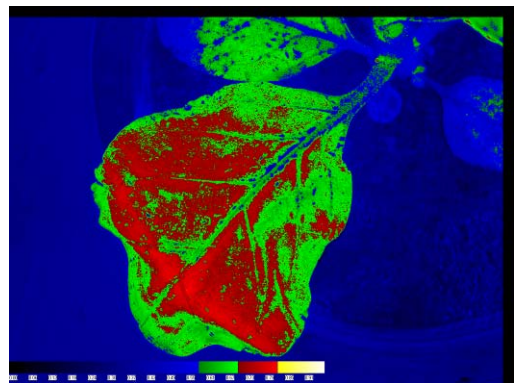
5 Νοέμβρη αλγόριθμος2

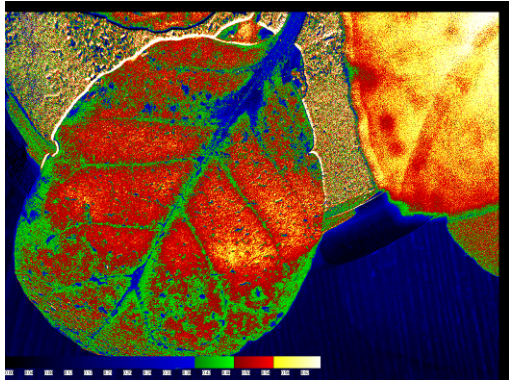


8 Νοέμβρη αλγόριθμος1

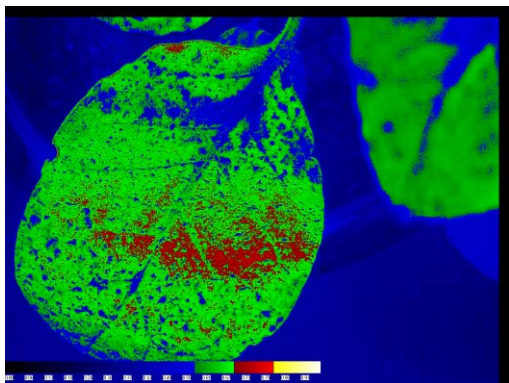
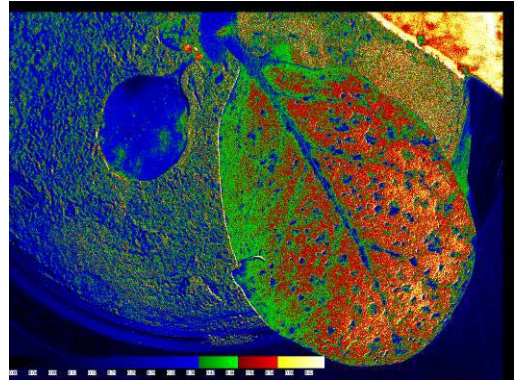


8 Νοέμβρη αλγόριθμος2

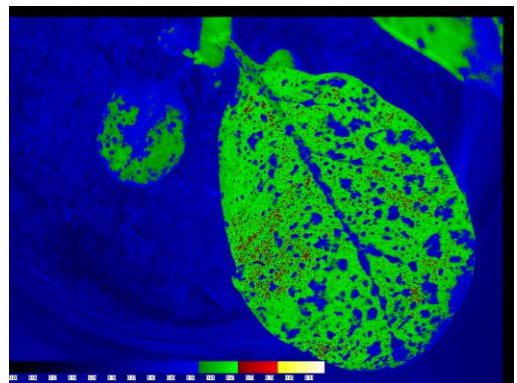


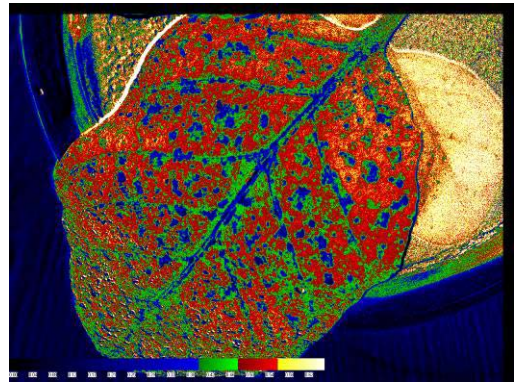
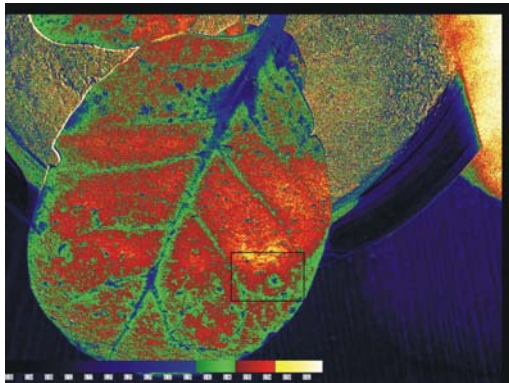


9 Νοέμβρη αλγόριθμος1

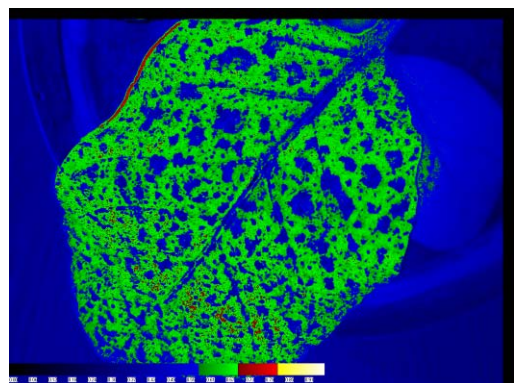
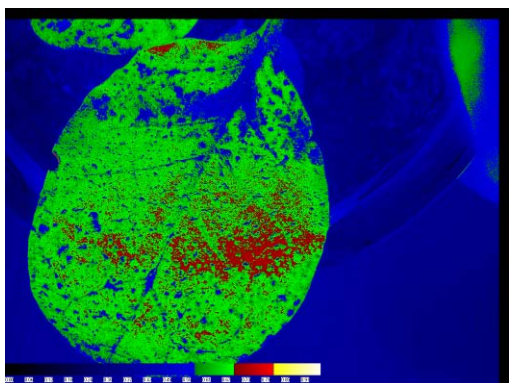
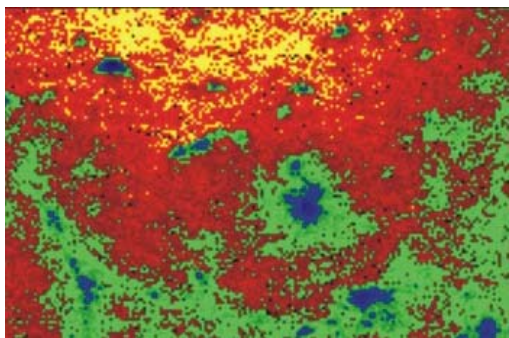


9 Νοέμβρη αλγόριθμος2

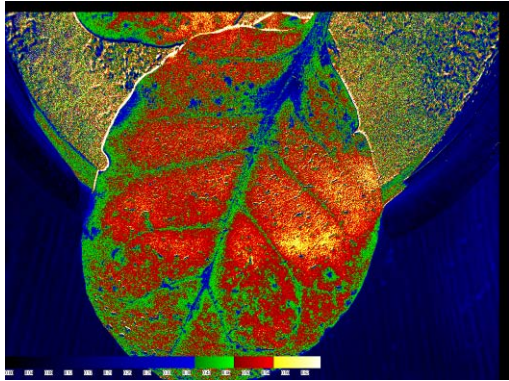




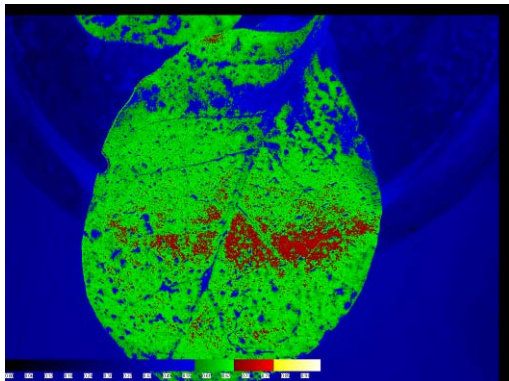
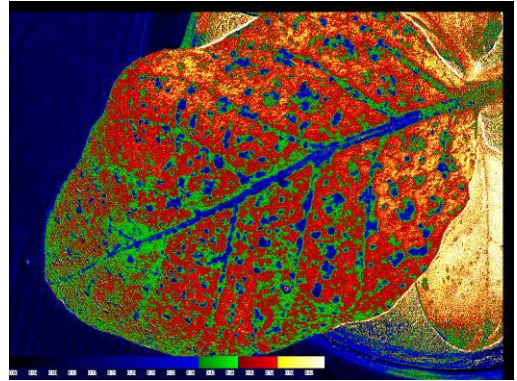
10 Νοέμβρη αλγόριθμος1



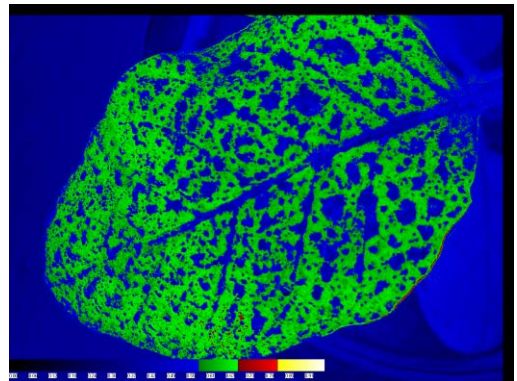
10 Νοέμβρη αλγόριθμος2



12 Νοέμβρη αλγόριθμος1



12 Νοέμβρη αλγόριθμος2



Συζήτηση

Γενικά

Η αποδόμηση των χρωμοφόρων είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία και αποτελεί δείκτη για τη βιολογική και παθολογική κατάσταση του φυτού. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερή η διαδικασία αποδόμησης της χλωροφύλλης είτε αυτή οφείλεται σε καταπόνηση λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών(μικρός χώρος, αδυναμία τροφής του φυτού), είτε οφείλεται σε καταπόνηση λόγω των βαρέων μετάλλων. Βέβαια η καταπόνηση, και προοπτικά ο θάνατος του φυτού, λόγω των βαρέων μετάλλων είναι πολύ μεγαλύτερη, και αυτό φαίνεται καθαρά από τα αποτελέσματα, οπότε η διαδικασία αποδόμησης των χρωμοφόρων είναι πολύ πιο γρήγορη.

Χωρικά χαρακτηριστικά

Στα διαγράμματα εξέλιξης της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στο χρόνο φαίνεται καθαρά ότι φθίνουσα πορεία που ακολουθούν και τα δύο είδη καπνού(σχήματα 1,2) είναι πολυωνιμική 2^{ου} βαθμού και κλίση της δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, πράγμα που σημαίνει ότι η αποδόμηση της χλωροφύλλης δεν είναι ιδιαίτερα γρήγορη. Η κλίση όμως της καμπύλης των γενετικά τροποποιημένων φυτών είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των άγριων, είναι μεγαλύτερη, πράγμα που σημαίνει ότι η διαδικασία αποδόμησης της χλωροφύλλης πραγματοποιείται γρηγορότερα. Αντιστρόφως ανάλογα λειτουργούν τα πράγματα στα επόμενα δύο διαγράμματα τα οποία εκφράζουν την αναλογία καροτενοειδών προς χλωροφύλλη στα φύλλα των φυτών. Αν λάβουμε υποψιν ότι το περιεχόμενο ενός φυτού σε καροτενοειδή παραμένει πρακτικά αναλοίωτο σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, το παραπάνω στοιχείο υπερτονίζει την αρχική υπόθεση, για γρηγορότερη αποδόμηση της χλωροφύλλης στα γενετικά τροποποιημένα, φού η κλίση της καμπύλης στα γενετικά τροποποιημένα είναι μικρότερη από ότι στα άγρια φυτά καπνού.

Αντίστοιχες παρατηρήσεις ισχύουν και για την ομάδα φυτών που ποτίστηκε με κάδμιο με σαφώς πιο έντονη την διαδικασία καταστροφής της χλωροφύλλης, πράγμα που καταδεικνύεται από τις μεγαλύτερες κλίσεις που αποτυπώνονται στα διαγράμματα 5-8 σε σχέση με τις κλίσεις που εμφανίζονται στα διαγράμματα των φυτών που δεν ποτίστηκαν με κάδμιο.

Ποιοτικά χαρακτηριστικά

Ένα χαρακτηριστικό που παρατηρούμε από τις χαρτογραφημένες εικόνες είναι ότι η αποδόμηση ξεκινά από μικρά μαύρα στίγματα(spots) τα οποία αναπτύσσονται χωρίς κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο, αλλά τυχαία και διάχυτα στην επιφάνεια των φύλλων. Βέβαια πρέπει να παρατηρήσουμε ότι σε περιοχές κοντά στον μίσχο και στα αγγεία(veins) των φύλλων συναντάμε πολύ μικρότερο αριθμό τέτοιων στιγμάτων. Με κέντρο αυτά τα στίγματα ξεκινά

η αποδόμηση της χλωροφύλλης κυρίως και επεκτείνεται ακτινικά στην επιφάνεια του φύλλου. Η παραπάνω παρατήρηση είναι η σημαντικότερη σε σημασία, διότι μπορεί να έχει διαγνωστική αξία για διάφορες παθήσεις έως και διάγνωση υποκλινικών χαρακτηριστικών. Επίσης σημαντικό είναι ότι γύρω από αυτά τα στίγματα το φυτό παρουσιάζει μια περιοχή με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε χλωροφύλλη, γεγονός το οποίο οφείλεται πιθανότητα σε απορρόφηση της χλωροφύλλης των κατεστραμμένων κυττάρων από γειτονικά, υγιή κύτταρα.

Όπως φαίνεται και από τις μετρήσεις τα άγρια φυτά σε σχέση με τα γενετικά τροποποιημένα επιδεικνύουν μεγαλύτερη αντοχή σε καταστάσεις stress. Αναλυτικότερα βλέπουμε ότι μέχρι ενός σημείου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, και τα δύο είδη φυτών αντέχουν στην καταπόνηση και μάλιστα τα γενετικά τροποποιημένα φυτά διατηρούν καλύτερη βιολογική κατάσταση από τα άγρια. Από ένα σημείο όμως και πέρα (2 Νοέμβρη) αποδόμηση της χλωροφύλλης στα γενετικά τροποποιημένα γίνεται με πολύ γοργούς ρυθμούς και το φυτό οδεύει πολύ γρηγορότερα στον βιολογικό θάνατο απ' ό,τι το άγριο φυτό. Το παραπάνω γεγονός καταδεικνύεται από την παρατήρηση κατά την οποία στις πρώτες μέρες του πειράματος που τα φυτά δεν υποβάλλονταν σε μεγάλη καταπόνηση τα στίγματα τόσο στα άγρια όσο και στα γενετικά τροποποιημένα ήταν παρόμοια σε αριθμό. Ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος ο αριθμός των στιγμάτων και προοπτικά οι περιοχές αποδόμησης της χλωροφύλλης στα γενετικά τροποποιημένα φυτά ήταν πολύ μεγαλύτερος και διαρκώς αυξανόμενος.

Τελικές παρατηρήσεις

Η κατανομή των χρωμοφόρων, όπως φαίνεται και από τις φασματικές εικόνες δεν ακολουθεί κάποιο πρότυπο, αλλά μάλλον είναι τυχαία. Αυτό που φαίνεται καθαρά είναι ότι στο μίσχο όσο και στα αγγεία το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη είναι μικρότερο, από ό,τι στο υπόλοιπο φύλλο. Επίσης φαίνεται καθαρά ότι η άγρια ποικιλία καπνού περιέχει περισσότερη χλωροφύλλη και πιθανόν λιγότερα καροτενοειδή από την γενετικά τροποποιημένη ποικιλία καπνού. Αυτή βέβαια η αναλογία αλλάζει ανάλογα με την διαδικασία αποδόμησης τόσο της χλωροφύλλης όσο και των καροτενοειδών. Έτσι στα τελευταία στάδια των μετρήσεων και αφού η αποδόμηση των χρωμοφόρων είχε προχωρήσει σε μεγάλο βαθμό βλέπουμε ότι τα άγρια φυτά υπερτερούν σε περιεχόμενο χλωροφύλλης και καροτενοειδών σε σχέση με τα γενετικά τροποποιημένα, ακόμα ένας δείκτης της γρηγορότερης διαδικασίας αποδόμησης των χρωμοφόρων για τα γενετικά τροποποιημένα φυτά.

Βιβλιογραφία

1. Anatoly A. Gitelson, Yoram J. Kaufman, Robert Stark, Don Rundquist, Novel algorithms for remote estimation of vegetation fraction, *Remote Sensing of Environment* 80 (2002) 76– 87
2. Anatoly A. Gitelson, Yuri Gritz , Mark N. Merzlyak, Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves, *J. Plant Physiol.* 160. 271–282 (2003)
3. Andrew D. Richardson, Shane P. Duigan and Graeme P. Berlyn, An evaluation of non invasive methods to estimate foliar chlorophyll content, *New Phytologist* (2002) 153 : 185–194
4. Daniel A. Sims, John A. Gamon, Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages, *Remote Sensing of Environment* 81 (2002) 337– 354
5. Frederick W. Koehler IV, Eunah Lee, Linda H. Kidder, E. Neil Lewis, Near infrared spectroscopy: the practical chemical imaging solution, *Spectroscopy Europe* 14/3 (2002)
6. Glen L. Ritchie, Use of ground-based canopy reflectance to determine radiation capture, nitrogen and water status, and final yield in wheat, *phD Thesis* 2003
7. Gregory A. Carter, Alan K. Knapp, Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration, *American Journal of Botany* SN(4): 677-684. 2001.
8. H.K. Lichtenthaler, A. Gitelson, M. Lang, Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and Aurea mutant tobacco by reflectance measurements, *J. Plant Physiol.* Vol 148. 483–493 (1996)
9. M.N. Merzylack, A.A. Gitelson, O.B. Chivkunova, A.E. Solovchenko, S.I. Pogosyan, Application of reflectance spectroscopy for analysis of higher plant pigments, *Russian journal of plant physiology*, vol. 50, no. 5 2003
10. Tong Wang, Spectral Vegetation Indices and Their Relationships With Nitrogen Stress Levels(Under the direction of Dr. Chi N. Thai), *May* 1992

Μελλοντικές βελτιώσεις – Μελλοντική δουλειά

Βελτιώσεις του συστήματος

Όπως είδαμε και στο παραπάνω κεφάλαιο οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήσαμε, τροποποιήθηκαν κατάλληλα λόγω περιορισμών του συστήματος. Ειδικότερα, η φασματική κάμερα καλύπτει την φασματική ζώνη 400-1000 nm με βήμα 20 nm. Αυτό μας περιορίζει στην επιλογή συγκεκριμένων μηκών κύματος, που χρειάζονται στους αλγόριθμους. Συνεπώς πρώτο μέλημα θα είναι η κατασκευή νέων φίλτρων που θα καλύπτουν τις απαιτούμενες στενότερες φασματικές ζώνες και η αντικατάσταση των παλιών φίλτρων της κάμερας με τα νέα.

Λογισμικό

Το υπάρχον λογισμικό, που παράγει τις χαρτογραφημένες εικόνες, χρησιμοποιεί συγκεκριμένους αλγόριθμους και σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Σημαντική βελτίωση για την απλοποίηση της δουλειάς και την περαιτέρω χρηστικότητα του λογισμικού θα είναι η δημιουργία μιας αυτοματοποιημένης διαδικασίας για την επιλογή οποιουδήποτε αλγόριθμου και σε οποιασδήποτε φασματικές ζώνες.

Μελλοντική δουλειά

Πρώτο μέλημα για την περαιτέρω δουλειά είναι η παραμετροποίηση συγκεκριμένων ασθενειών φυτών. Αναλυτικότερα θα προσπαθήσουμε να εξειδικεύσουμε την διαδικασία για μια πλειάδα φυτικών ασθενειών που αφορούν την φυτική ποικιλία της περιοχής. Τέλος θα προσπαθήσουμε να συνδυάσουμε την παραπάνω διαδικασία με την μικροσκοπία, εφαρμόζοντας το σύστημα σε μικροσκόπια προκειμένου να μελετήσουμε φυτικούς ιστούς όσον αφορά τα μικροδομικά τους χαρακτηριστικά σε μεγαλύτερο βάθος.

Παράρτημα

Δημιουργία γενετικά τροποποιημένου καπνού που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη LeGST-T2

Η αντιοξειδωτική τρανσφεράση της γλουταθειόνης LeGST-T2 ενσωματώθηκε σε φυτά καπνού με την παρακάτω μεθοδολογία:

Το πλαίσιο ανοιχτής ανάγνωσης (Open Reading Frame) του γονιδίου LeGST-T2, το οποίο και εμπεριέχει τις πληροφορίες για την παραγωγή της πρωτεΐνης, συντήχθηκε στο C-τελικό μέρος της με τον αντιγονικό επίτοπο V5 και μια αλληλουχία 6 ιστιδινών.

Το χιμαιρικό γονίδιο ενσωματώθηκε στο αγροβακτηριδιακό πλασμίδιο PROK2 με τρόπο ώστε το γονίδιο να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του προαγωγέα 35S. Το αγροβακτηρίδιο που έφερε το pROK2/LeGST-T2(V5-6xHIS) πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για να μολύνει αποστειρωμένα τεμάχια από φύλλα καπνού (*Nicotiniana tabacum* cv. Samsun). Η μεταμόρφωση των φυτικών κυττάρων από το αγροβακτηριδιακό πλασμίδιο επιλέχθηκε με την χρήση του αντιβιοτικού καναμυκίνη.

Τα φυτά που αναγεννήθηκαν μεταφέρθηκαν σε γλάστρες και χαρακτηρίστηκαν ως προς την παραγωγή της ετερόλογης πρωτεΐνης κάνοντας χρήση στυπώματος Western και ανίχνευση με το αντίσωμα που αναγνωρίζει τον αντιγονικό επίτοπο V5 (Mohamed, A. and Makris, A.M., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις μετρήσεις είναι αυτογονιμοποιημένα της F2 γενιάς.

Ο ρόλος των πρωτεϊνών GST

The classic definition of GSTs is based on their ability to catalyze the transfer of the tripeptide glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine (GSH)) to a co-substrate with a reactive electrophilic center, thus forming a polar S-glutathionylated conjugate. This is considered to be a crucial step in the detoxification process, because the produced S-glutathionylated metabolites are either further catabolized and excreted (in animals) or tagged for vacuolar import because of the lack of effective excretion pathways (in plants).

GSTs also catalyze GSH-dependent peroxidase reactions by supporting the nucleophilic attack of GSH on hydroperoxides, thus reducing the organic hydroperoxides to the less toxic monohydroxy alcohols. Other cellular roles attributed to GSTs are as follows: the conjugation of natural products, the binding and storage of various small molecules, and the mediation of regulatory signals through protein-protein interactions. Recently, a role of GSTs in stress tolerance has been demonstrated. Expression of GSTs in plants is highly responsive to biotic and abiotic stress and to a wide variety of

stress-associated chemicals, including 2,3 dichlorophenoxyacetic acid and other synthetic and natural auxins, salicylic acid, methyl jasmonate, abscisic acid, and H₂O₂. Tobacco seedlings overexpressing a tobacco Tau class GST are more tolerant to chilling and osmotic stress than wild-type plants (17), whereas a GST participating in oxidative stress tolerance was discovered in black grass. Furthermore, a tomato Tau class enzyme, termed BI-GST, was found to confer resistance to oxidative stress when expressed in yeast cells (Kampranis et al., 2000; Kili et al., 2004). LeGST-T2 was isolated as a heterodimerising protein to BI-GST. Expression of the protein in yeast enhances cell resistance against prooxidants.

1. Kampranis, S.C., R. Damianova, M. Atallah, G. Toby, G. Kondi, P.N. Tsihli, and A.M. Makris, A novel plant glutathione S-transferase/oxidase suppresses Bax lethality in yeast, *J Biol Chem.* 275:29207-16. 2000.
2. Kili, K.G., N. Atanassova, A. Vardanyan, N. Clatot, K. Al-Sabarna, P.N. Kanellopoulos, A.M. Makris, and S.C. Kampranis, Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *J Biol Chem.* 279:24540-51, 2004.