

INAUGURAL - DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich -Mathematischen
Gesamtfakultät**

**der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg**

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Nadiya Smolyar

aus Burimka, Ukraine

Tag der mündl. Prüfung: 23. Juli 2003

Bildgebende Spektroskopie an Pflanzenblättern

**Gutachter: Prof. Dr. Bernd Jähne
Prof. Dr. Kurt Roth**

Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurden innovative Methoden der bildgebenden Spektroskopie entwickelt, die für Untersuchungen der Spektralcharakteristiken und räumlichen Verteilung von Wasser und Chlorophyll in Pflanzenblättern verwendet wurden. Dafür wurden zwei bildgebende Spektrometer für VIS und NIR Spektralbereich unter Verwendung der CCD-Kameras aufgebaut: ein ortsauflösende CCD-Prismenspektrometer für Aufnahmen der Bildspektren mit der Spektral- und Raumkoordinate; ein multispektrale bildgebende CCD-Spektrometer für die Ermittlung von Spektralbildern bei diskreten Wellenlängen, die durch die Bandpaßfilter ausgewählt wurden. Im Vergleich zu den herkömmlichen Serienspektrometern hat das entwickelte bildgebende CCD-Spektrometer bessere Charakteristiken.

Es wurden innovative Bildverarbeitungsmethoden entwickelt, die die Analyse der spektralen Bildsequenz und Spektren der einzelnen Strukturelemente der heterogenen Objekte ermöglichen. Der Einfluß der Mehrfachlichtstreuung auf die optischen Charakteristiken der Pflanzenblätter wurde untersucht. Dabei wurde eine innovative Methode zur Ermittlung der Istwerte der Absorption unter der Berücksichtigung der Wechselwirkung der Mehrfachlichtstreuung und Absorption entwickelt. Die räumliche Spektralcharakteristiken für das Blattgewebe und für die Adern wurden untersucht. Eine spektrale Methode für Bestimmung der Verteilung von Wasser und Chlorophyll in Pflanzenblättern wurde entwickelt. Zum ersten Mal wurden die detaillierten Profilbilder des Wassergehaltes in Pflanzenblättern erhalten und analysiert. Vier Wasserzustände in den Pflanzenblättern wurden entdeckt und untersucht. Eine Transformation der Wasserzustände bei physiologischen Prozessen wurde festgestellt und analysiert. Die entwickelten Methoden der bildgebenden Spektroskopie haben allgemeine Bedeutung und können für die Untersuchungen der heterogenen Mikro- und Makroobjekte erfolgreich verwendet werden.

Abstract Image Spectroscopy on Plant Leaves

In this work, new methods of image spectroscopy were developed that were used for studying spectral characteristics and spatial distribution of water and chlorophyll in plant leaves. Two image spectrometers for VIS and NIR areas using CCD cameras were built: a prismatic CCD spectrometer for receiving imagespectra with spectral and spatial coordinate; a multispectral CCD image spectrometer for investigation of spectral images for discrete wavelengths using a set of bandpass filters. In comparison with serial spectrometers, the developed image spectrometer has better characteristics.

A innovative method for the processing of the spectral images was developed, allowing the analysis of a spectral images sequence and spectra of separate structural elements of inhomogeneous objects. The influence of multiple light scattering on optical characteristics of plant leaves was investigated. A method to determine the true value of absorption was developed considering the interaction of multiple light scattering and absorption. Separated spectra for plant leaves tissue and vein were investigated. A spectral technique to find detailed distribution of water and chlorophyll in leaves was developed. For the first time a profile images of water distribution on plant leaves were obtained. Four water states in the plant leaves were discovered and investigated. A transformation of water states during physiological processes was shown and analyzed. The developed methods of image spectroscopy have a general character and can be used for studying non-uniform micro- and macroobjects.

***"wunderbar sind
Deine Werke,
das erkennt meine Seele."***

Bibel, Altes Testament: [Gen 1,31; 2,1]

***Meinen lieben Eltern, Geschwistern
und meinem Freund M. Korniyenko***

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Bildspektrum	2D Digitalbild mit den Spektral- und Raumkoordinaten
Bildpixel	elementares Element des Digitalbildes
CCD	Charge Coupled Device (Chip zur Bildaufnahme in digitalen Kameras)
Chl	Chlorophyll
DSA	Densitogramm-Spektral-Analyse
DISP	Digital Image Sequence Processing (digitale Bildsequenzverarbeitung)
EtOH	Ethanol
EWZ	energetischer Wasserzustand
FIR	fernes Infrarot
IR	Infrarot
MLS	Mehrfachlichtstreuung
MIR	mittleres Infrarot
NIR	nahes Infrarot
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
OD	Optische Dichte
Spektralbild	Absorption- oder Transmission-Digitalbild bei diskreten Wellenlängen
T	Transmission
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1. 1. Motivation und Problemstellung	1
1. 2. Zielsetzung und Überblick der Ergebnisse	2

2. Physikalische Grundlagen

2. 1. Wechselwirkung des Lichtes mit Materie	5
2.1.1. Optische Spektroskopie	5
2.1.2. Infrarotspektroskopie	8
2.1.3. Lichtstreuung	9
2.2. Physikalische Eigenschaften des Wassers	12
2.2.1. Struktur des Wassermoleküls	12
2.2.2. Struktur von flüssigem Wasser	14
2.2.3. Einige biophysikalische Eigenschaften von Wasser	16
2.2.4. Spektroskopie von Wasser	19
2.3. Digitale Bildverarbeitung und Fernerkundung	22
2.3.1. Computergesteuerte Bildverarbeitung	22
2.3.2. Multispektrale Bildverarbeitung	26
2.3.3. Bildgebende Spektrometrie für Erfassung von Vegetation	28

3. Botanische Grundlagen

3.1. Pflanzenblattaufbau	31
3.1.1. Makroskopischer Blattaufbau	31
3.1.2. Mikroskopischer Blattaufbau	33
3.2. Pflanzenblatt als optisches System	36
3.2.1. Grünes Blatt - eine Lichtmaschine	36
3.2.2. Optik des Blattes	37
3.2.3. Blattoptik Modelle	42

3.3. Pflanzenblatt als photosynthetisches System	44
3.3.1. Photosynthese als Energieumwandlung	44
3.3.2. Photosynthesepigmente	46
3.3.3. Spektroskopie der Pflanzenblätter im VIS Bereich	48
3.4. Pflanzenblatt als wäßriges System	51
3.4.1. Wasser als physiologischer Faktor für Pflanzen	51
3.4.2. Wasserverteilung im Blattgewebe	52
3.4.3. Bestimmung des Wassergehaltes im Blattgewebe	53
3.4.4. Energetischer Zustand des Pflanzenwassers	55
3.4.5. Spektroskopie der Pflanzenblätter im NIR Bereich	56

4. Material und Apparatur

4.1. Untersuchungsobjekte	58
4.2. Meßgeräte	61

ERGEBNISSE

5. Entwickelte Methoden

5.1. Methode der bildgebenden Spektroskopie	64
5.1.1. Allgemeine Grundlagen der Spektrometertechnik	64
5.1.2. Verfahren der bildgebenden Spektroskopie	66
5.1.3. Bildgebendes CCD-Goniometer-Spektrometer	67
5.1.4. Etappen und technische Durchführung des Verfahrens	69
5.1.4. Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse	76
5.2. Methode der orts aufgelösten Spektroskopie	78
5.2.1. Aufbau und Funktionsprinzip des CCD-Prismenspektrometers	76
5.2.2. Technische Durchführung des Verfahrens	82

RESULTATE

6. Bildgebende VIS-Spektroskopie von Pflanzenblättern Chlorophyllverteilung und -Zustand

6.1. Spektralcharakteristiken von Photosynthesepigmenten	87
6.1.1. Spektren der <i>in vitro</i> Chlorophylle in den Extrakten	87
6.1.2. Spektren der <i>in vivo</i> Chlorophylle in Pflanzenblättern	92
6.2. Goniometrische Spektraluntersuchungen der Pflanzenblätter	98
6.2.1. Goniometrische Spektralmessungen an Pflanzenblättern	98
6.2.2. Spektrale Lichtindikatoren von den Pflanzenblättern	103
6.3. Bildgebende VIS-Spektroskopie an Pflanzenblättern	108
6.3.1. Spektralbilder der Pflanzenblätter im VIS-Bereich	108
6.3.2. Densitogramm-Spektral-Analyse der <i>in vivo</i> Chlorophylle	110

7. Bildgebende NIR-Spektroskopie von Pflanzenblättern Blattwassergehalt und -Zustand

7.1. Spektroskopie und Visualisierung des Blattwassers	116
7.1.1. Spektrale Serien der Schwingungsmoden von Wasser	118
7.1.2. Spektrale Untersuchungen des Blattwassers	121
7.1.3. Bildgebende Spektroskopie des Blattwassers	125
7.1.4. Densitogramm-Spektral-Analyse der Spektralbilder	128
7.2. Bestimmung des Wassergehaltes in Pflanzenblättern	134
7.2.1. Extraktion der Wasserbanden aus Extinktionsspektren	134
7.2.2. Spektralbilder der normierten Blattwasserabsorption	137
7.2.3. Spektrale Bestimmung der effektiven Wasserdicke	140
7.2.4. Verstärkung der Absorptionsbande infolge der MLS	144
7.2.5. Spektrale Visualisierung der Blattwasserverteilung	150
7.3. Spektroskopie verschiedener Wasserzustände in Blättern	154
7.3.1. Entdeckung verschiedener Wasserzustände in Blättern	154
7.3.2. Visualisierung und Analyse der Wasserzustände	164
7.3.3. Zeitliche Dynamik der Wasserzustände in Blättern	166
7.3.4. Raumspektren von Wasser der Pflanzenblätter	168

8. ZUSAMMENFASSUNG	171
9. LITERATUR	177
10. ANHANG	184
DANKSAGUNG	193

Kapitel 1

Einleitung

1.1. Motivation und Problemstellung

Eine kosmische Erscheinung nennt man das Leben auf der Erde, weil es existiert durch die Sonnenenergie. Durch Photosynthese wird Lichtenergie in die latente chemische Energie umgewandelt, die allen Lebensprozessen zugute kommt. Im Mittelpunkt dieses Prozesses, an seinem Anfang steht ein Pflanzenblatt - ein Meisterwerk der Natur und insbesondere das Meisterwerk des optischen Systems. Keine physikalische Größe steuert und fördert die Entwicklung der Pflanzen in so starkem Maße wie Licht. Das Licht ist elektromagnetische Strahlung, die aufgrund ihrer Qualität (unterschiedliche Wellenlängen) und Intensität charakterisiert werden kann. Pflanzen messen beide Parameter und reagieren dementsprechend. Es gibt eine Vielzahl lichtinduzierter, lichtwellenabhängiger Reaktionen, und es gibt in den Pflanzen folglich auch eine Reihe unterschiedlicher Lichtrezeptoren.

Ein Pflanzenblatt stellt ein kompliziertes optisches System dar, das über eine Fähigkeit verfügt, wirksam und anscheinend optimal die Sonnenenergie auszunutzen. Die optischen und spektralen Eigenschaften des Pflanzenblattes werden zur Zeit intensiv erforscht. Es gibt schon Versuche, die Prozesse zu beschreiben, die bei der Wechselwirkung des Lichtes mit dem Pflanzenblatt stattfinden. Die ersten optischen Blattmodelle wurden schon entwickelt [Maier1999, Vogelmann 2000, Berdnik 2001]. Aber es gibt noch keine vollständige Theorie der Blattoptik und alle Modelle erklären nur einen Teil der beobachteten optischen Charakteristika des Blattes. Trotz der zahlreichen Untersuchungen steht man auch auf diesem Gebiet noch am Anfang. Um so mehr sind weitere experimentelle und theoretische Forschungen zwecks Beschreibung der Blattoptik notwendig.

Die Erforschung der optischen Eigenschaften der Blätter hat eine große Bedeutung für das Verständnis der Grundprinzipien der Sonnenenergieassimilation und der Photosynthesemechanismen sowie der Adaptierungsprozesse in den Pflanzen. Mithilfe der nichtinvasiven Methode der optischen Spektroskopie können qualitative und quantitative Informationen zur chemischen und physikalischen Zusammensetzung der pflanzlichen Inhaltsstoffen gewonnen werden. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden Versuche unternommen, die remote sensing Methoden der optischen Spektrometrie für eine objektive Einschätzung des physiologischen Pflanzenzustandes zu verwenden. Eine besonders intensive Entwicklung bekam diese Methode in den letzten zwei Jahrzehnten im Zusammenhang mit der Entwicklung der Fernerkundungsmethoden zur Reflexionspektralanalyse - einschließlich der Satelitenaufnahme. Es gibt Möglichkeiten für die Einschätzung der globalen Photosyntheseproduktivität auf der Erde und für die Verfolgung des Vegetationszustandes unter dem Einfluß verschiedener ökologischer Faktoren [Hildebrandt 1996, Wewel 1998, Pakzad 2001, Menenti 2002]. Die Erforschung der Wechselwirkung des Lichtes mit dem Blattgewebe ist auch für eine Interpretation der Daten, die mit Hilfe der Fernerkundung erstellt wurden, sehr wichtig.

Der Gehalt der Photopigmente im Blatt ist ein wichtiges und empfindliches Merkmal des physiologischen Zustandes der Pflanzen, das die Photosyntheseintensität, den adaptiven Umbau der Veränderungen bei der Ontogenese, bei der Alterung und bei Stressfaktoren widerspiegelt. Obwohl in den letzten Jahren einige Fortschritte in der spektrophotometrischen Bestimmung der Pigmentkonzentration in dem Pflanzengewebe gemacht wurden, ermöglichen alle diese Methoden, nur noch den allgemeinen Pigmentengehalt im Blatt festzustellen. Es gibt keine spektrale Methode zur Erfassung der räumlichen Verteilung von Pigmenten und anderen Inhaltsstoffen des Pflanzenblattes.

Pflanzen bestehen größtenteils aus Wasser. Das Pflanzenblatt enthält im Durchschnitt 80-90% Wasser. So stellen die Kenntnisse des Blattwasserhaushaltes und der Blattwasserverteilung einen sehr wichtigen Sektor der Pflanzenkunde dar. Auch wenn die Forschung auf diesem Gebiet in den vergangenen Jahrzehnten große Fortschritte gemacht hat, werden zur Bestimmung des pflanzlichen Wassergehaltes immer noch die traditionellen Methoden (Wasserdruckapparatur, Thermography, Turgormeßelektronik) benutzt [Buschbom 1970, Kreeb 1986, Lösch 2001]. Die nichtinvasiven spektralen Verfahren für die Bestimmung des pflanzlichen Wassergehaltes sind noch kaum entwickelt. Bisher werden Reflexionscharakteristika der Vegetation im Infrarotbereich nicht so sehr für Wassergehaltsmessungen am Blatt oder an Einzelpflanzen, sondern zur Erfassung von Wassergehaltsänderungen in Pflanzenbeständen herangezogen. Die Haupthindernisse zur Anwendung der optischen Spektralmethoden für die Untersuchung des Blattwassers ist komplizierte Struktur der Transmissions- und Absorptionsspektren des Blattes. Die Natur der Wasserabsorptionsbanden im Blatt ist bis heute kaum erklärt.

Spektralcharakteristiken der Blätter werden seit der letzten Jahrzehnte intensiv untersucht [Gates 1965, Gausman 1985, Fukshansky 1993]. Aber ein komplizierter Blattaufbau und Vorhandensein verschiedener Inhaltstoffe erschwert die Spektraluntersuchungen der Blätter. Eine Besonderheit der Pflanzenblätter ist eine starke Inhomogenität ihrer Struktur. Das Licht wird in den Blättern mehrfach gebrochen, reflektiert und gestreut, weshalb das Strahlungsfeld in Blättern sehr kompliziert wird. Dabei hat die Mehrfachlichtstreuung (MLS) einen starken Einfluß auf die optischen Spektren der Blätter. Um den Einfluß der MLS auf die optischen Spektren der Pflanzenblätter zu minimieren, wurde seit 1959 zur Messung der spektralen Eigenschaften eines Blattes eine integrierende Kugel (Ulbricht Kugel) verwendet. Damit kann die Strahlung, die in alle Richtungen gestreut wurde, für das transmittierte und reflektierte Licht besser gemessen werden. Dabei könnten die wahren Absorptions- und Reflexionsspektren von den Blättern aufgenommen werden. Doch führt diese Methodik zu einer Vermischung (Integrieren) der Information von verschiedenen Blatteilen.

Digitale Spektralbilder mit mehreren Tausend bzw. Millionen von Bildelementen könnten viel aussagekräftiger als die integrierten, oder die nur an einem Punkt des Blattes gemessenen Spektren sein. Außerdem können aus der Musterverteilung der Spektralsignale an einem Digitalbild weitere Schlußfolgerungen über die optischen und strukturellen Eigenschaften vom Blatt gezogen werden. Doch sind die spektrale Aufnahme eines Blattes und die Minimierung des MLS-Einflusses zwei widersprüchlichen Anforderungen. In diesem Zusammenhang mußte eine ausführliche Erforschung der Beiträge der Absorption und der MLS in die optischen Spektren der Blätter durchgeführt werden, um Methoden der Minimierung des MLS-Einflusses auf die gemessenen räumliche Darstellungen zu erarbeiten.

1.2. Zielsetzung und Überblick der Ergebnisse

Zielsetzung

Eine Erfassung der räumlichen Verteilung und der Konzentrationsdynamik von Inhaltstoffen (Photopigmenten, Wasser) und eine Strukturaufklärung (Blattadern, Interzellularen) im wachsenden Pflanzengewebe mit Hilfe der optischen bildgebenden Methoden könnten neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Pflanzenphysiologie eröffnen. Moderne Bildaufnahme- und Bildverarbeitungsverfahren bieten ein großes Potential, um das Blattinnere *in vivo* nichtinvasiv zu untersuchen und "Unsichtbares" sichtbar zu machen. Doch bis jetzt existieren noch kaum Methoden der digitalen bildgebenden Spektroskopie zur Untersuchung der optischen Eigenschaften des Blattes, die die Bestimmung der lokalen Verteilung der Blattstrukturen und der Inhaltstoffen zulassen. Solche Methode könnten ein besseres Verständnis der optischen Eigenschaften der Blätter sowie der Besonderheiten des Pflanzenwachstums ermöglichen. Die oben

geschilderten Fragestellungen erfordern ein neues Instrumentarium an Bildaufnahme- und Bildanalyse-Techniken. Wünschenswert wäre eine Darstellung der zwei-dimensionalen Verteilung verschiedener Inhaltsstoffe über die Blattfläche und zwar die direkte orts aufgelöste Spektralmessung des Chlorophyll- und Wassergehaltes an Pflanzenblättern.

Um diese Ziel zu erreichen, ist eine automatisierte remote sensing Technik notwendig, für die bildgebenden Aufnahme und Auswertung der räum-zeitlichen Dynamik der Spektraldaten von Pflanzenblättern. Doch sind die spektrale Aufnahme eines Bildes vom Pflanzenblatt und die Erfassung des Einflusses der Mehrfachlichtstreuung auf die gemessenen Spektralsignaturen zwei widersprüchlichen Anforderungen. In diesem Zusammenhang muß die Interaktion der Lichtabsorption und Mehrfachlichtstreuung im Blatt ausführlich erforscht werden.

Ziel

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Anwendung der Methode der bildgebenden Spektroskopie zur Untersuchung der Spektralcharakteristiken sowie der räumlichen Verteilung von Inhaltsstoffen und Strukturen der Pflanzenblätter.

Als Ergebnis sollten spektrale Methoden zur Bildaufnahme und Bildverarbeitung der Pflanzenblätter entwickelt und getestet werden, mit denen

- die spektral-optischen Charakteristiken der Blattstruktur,
- eine Interaktion der Mehrfachlichtstreuung und Lichtabsorption im Blattgewebe,
- die Verteilung und der Gehalt von Chlorophyll und Wasser eines Blattes gemessen und analysiert werden können.

Ergebnisse

Mit Hilfe der in dieser Arbeit aufgebauten neuartigen bildgebenden CCD-Spektrometer und entwickelten Bildverarbeitungsmethoden wurden die optischen Eigenschaften des Pflanzenblattes orts aufgelöst untersucht sowie die räumliche Chlorophyll- und Wasserverteilung in Blättern quantitativ bestimmt. Dadurch öffnen sich neue Möglichkeiten für die Untersuchung der physiologischen Prozesse im Pflanzenblatt.

Aus den mithilfe der bildgebenden Spektroskopie gemessenen Daten kann viel mehr Information gewonnen werden, die den physiologischen Zustand der Pflanzen charakterisiert, als aus den üblichen über die Blattfläche integrierten spektralen Daten. Mit Hilfe des entwickelten CCD-Prismen-Spektrometers wurden die *Bildspektren* erhalten. (Kapiteln 5.2 und 6.2). Außer der kontinuierlichen spektralen Koordinate, wie es auch in den traditionellen Spektrometern der Fall ist, haben die Bildspektren eine räumliche Koordinate. Dies ermöglicht es, eine Reihe von Spektren für verschiedene Bereiche entlang eines Streifens an der Blattoberfläche zu analysieren. Für das Studium verschiedener Blattbereiche, soll eine durch eine Spalt gewählte Linie über die Blattoberfläche abgetastet (gescannt) werden.

Das Studium der *Spektralbilder* wurde mit Hilfe des entwickelten bildgebenden CCD-Spektrometers im diskreten Spektralbereichen durchgeführt. (Kapitel 5.1) Als ein Dispersivelement diente in diesem Fall ein Satz der Interferenz-Bandpaßfilter. Eine einzigartige Besonderheit solches Spektrometerschema neben seiner Einfachheit ist das Erhalten der räumlichen Spektralbilder des ganzen Objektes. Dies ermöglichte die optischen Charakteristiken der Blattgewebe und Adern sowie die räumliche Verteilungen von Wasser und Chlorophyll über die Blattfläche zum ersten Mal zu untersuchen. (Kapiteln 6.3, 7.1; 7.2; und 7.3) Ebenfalls zum erstenmal wurden die *Raumspektren* erstellt, die die spektrale Heterogenität der einzelnen strukturellen Blattelemente (Blattgewebe, Adern) beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die innovative Methoden der Minimierung des MLS-Einflusses auf die gemessenen räumliche Spektralcharakteristiken der Pflanzenblätter entwickelt. Weil die MLS-Spektren in sich selbst eine reiche aber wenig untersuchte und angewendete Information über die optischen Eigenschaften und die Struktur der Blätter enthalten, wurde in der Arbeit eine ausführliche Erforschung der spektralen Charakteristiken der Blätter durchgeführt. Diese erlaubte, die Beiträge der MLS und der Absorptionsbanden in den Extinktionsspektren zu bestimmen. (Kapiteln 6.1 und 7.1) Dabei mußte das Problem der Wechselwirkung der Absorptions- und Streuprozesse von Licht und die Tatsache, daß ihre Beiträge in die Extinktion nicht additiv sind, gelöst werden. Auch die Veränderung der Bandenform und die Koeffizienten der Bandenverstärkung aufgrund einer Vergrößerung der Weglänge des Lichtes in dem Blatt sollten gefunden werden. Für die Erforschung der räumlichen Verteilung des gestreuten Lichtes wurden spektrale Indikatoren der Lichtstreuung am Blatt untersucht. (Kapitel 6.2)

Die Pflanzenblätter haben sich als ideale Modellobjekte für die Entwicklung der physikalischen Methoden der bildgebenden Spektroskopie erwiesen. Ihr flacher Aufbau und kleine Dicke sind ideal, um die spektralen Transmissionsbilder zu gewinnen. Damit könnten allgemeine Gesetzmäßigkeiten der Spektralcharakteristika der heterogenen Medien untersucht werden. Zugleich ist die Blattdicke ausreichend genug für eine starke Erscheinung der MLS-Effekte und damit für die Untersuchung der Wechselwirkung der MLS-Prozesse und der Absorption. In Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Bestimmung der Istwerte der Absorptionsbanden unter der Berücksichtigung des "Eintauchens" der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund ausgearbeitet. (Kapiteln 6.3 und 7.2) Ebenfalls wurde eine innovative Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse für die Auswertung der Spektralbilder entwickelt. (Kapiteln 5.1, 6.3 und 7.1) Diese Methoden haben ihre allgemeine Bedeutung und können für Untersuchungen einer ganzen Palette der inhomogenen stark streuenden Objekte angewendet werden.

Die Spektralcharakteristiken des Blattwassers sind seit langem untersucht aber kaum erklärt. Deshalb wurden drei spektrale Serien der Wasserbanden im NIR-Bereich definiert und analysiert. (Kapitel 7.1) Die Gesetzmäßigkeiten der höchsten Schwingungsmoden von Wasser wurden festgestellt. Eine Methodik zur Bestimmung des Wassergehaltes in den Pflanzenblättern mittels des Vergleiches der Absorptionswerte von Wasser der Pflanzenblätter und destilliertem Wasser wurde entwickelt. (Kapitel 7.2) Dabei wurde der Verstärkungsfaktor der Wasserbanden infolge der MLS ausgerechnet und berücksichtigt. Die ermittelten Werte des Blattwassergehaltes stimmen gut mit realen Konzentrationen überein, die mit Hilfe der gravimetrischen Methode gewonnen wurden. Die Methodik wurde und für die Analyse des Blattwassergehaltes mittels der Absorptionsbilder verallgemeinert. Zum ersten Mal wurden die detaillierte Profilbilder der Wasserverteilung über die Blattfläche erstellt. (Kapitel 7.2) Spektrale Eigenschaften von Wasser in Pflanzenblättern wurden erforscht, dabei wurden vier Wasserzustände in den Pflanzenblättern entdeckt und untersucht. (Kapitel 7.3) Eine Transformation der Wasserzustände bei physiologischen Prozessen wurde festgestellt und analysiert.

Die in vorliegender Arbeit entwickelten Methoden der bildgebenden Spektroskopie haben allgemeine Bedeutung und können für die nichtinvasiven Untersuchungen der heterogenen Mikro- und Makroobjekte verwendet werden.

Kapitel 2

Physikalische Grundlagen

2.1. Wechselwirkung des Lichtes mit Materie

2.1.1. Optische Spektroskopie

Optische Spektroskopie im Bereich vom Ultraviolett bis zum Infrarot ist für eine schnelle und weitgehend zerstörungsfreie Bestimmung von Inhaltsstoffen und Parametern der lebenden Pflanzen und des verschiedenen Pflanzenmaterials besonders geeignet. Ebenfalls sind unterschiedliche Mechanismen der optischen Wechselwirkung des Lichtes mit dem Pflanzengewebe wirksam, um verschiedene Aussagemöglichkeiten für pflanzliches Gewebe erhalten zu können.

Licht - ursprünglich nur die sichtbare elektromagnetische Strahlung - dient in der Naturwissenschaft und Technik auf vielfältige Weise der Strukturaufklärung von Stoffen sowie qualitativen und quantitativen Bestimmungen.

Mitte des 19. Jahrhunderts entwickelten der Chemiker R. W. Bunsen und der Physiker G. R. Kirchhoff in Heidelberg die Spektralanalyse als wissenschaftliche Methode. Seit dem hat sich die optische Spektroskopie zu einer vielseitigen analytischen Methode entwickelt. Die Spektrallinien und -banden sind für jedes chemische Element und für jedes Molekül so typisch, wie ein Fingerabdruck. Man kann die Elemente also mit der Spektroskopie identifizieren. Mithilfe der optischen Spektroskopie können qualitative und quantitative Informationen zur chemischen und physikalischen Zusammensetzung einer Vielzahl von Materialien gewonnen werden. Festkörper, Flüssigkeiten und Gase können, sowohl im Labor als auch vor Ort, analysiert werden. Die Anwendungsgebiete reichen von so profanen Dingen wie die schnelle, qualitative Erkennung von Stoffsorten im „gelben Sack“ bis hin zu astronomischen Fragestellungen. Die Informationen werden gewonnen, indem man die nichtzerstörende Interaktion elektromagnetischer Strahlung (Licht), von Infrarot bis hin zu Ultraviolett, mit Substanzen untersucht.

Spektrale Wellenlängenselektion des Lichtes

In der optischen Spektroskopie unterscheidet man zwischen:

- | | | | |
|--------------|----------------------|---------------|-----------------------------------|
| • UV | ultraviolettes Licht | 100 - 380 nm | 100 000 - 26 300 cm ⁻¹ |
| • VIS | sichtbares Licht | 380 - 760 nm | 26 300 - 13 300 cm ⁻¹ |
| • NIR | nahes Infrarot | 0,76 - 2,5 µm | 13 300 - 4 000 cm ⁻¹ |
| • MIR | mittleres Infrarot | 2,5 - 25 µm | 4 000 - 400 cm ⁻¹ |
| • FIR | fernens Infrarot | 25 - 100 µm | 400 - 100 cm ⁻¹ |

Durch Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit einem stofflichen Medium kann es zu Wechselwirkungsprozessen kommen, die mittels der Spektroskopie untersucht werden können. Wechselwirkung des Lichtes mit Molekülen passiert durch :

- *Elektronenanregungen* in UV und VIS Bereich
- *Rotation und Schwingungen* im Infrarot Bereich

Der sichtbare Teil der elektromagnetischen Strahlung wird als das VIS (visible=sichtbar) bezeichnet. Er umfaßt den Wellenlängenbereich von 380 bis 760 nm. Spektroskopisch gesehen ist der VIS Bereich durch die Absorption von π -Elektronen innerhalb der Moleküle gekennzeichnet. Im VIS Bereich absorbieren Moleküle photosynthetischer Pflanzenpigmente das Sonnenlicht. Dadurch sind die Pflanzen in der Lage, die

Sonnenenergie in die chemische Energie der organischen Substanzen umzusetzen. Dagegen sind Luft und Wasser in diesem Bereich transparent, was eine der wesentlichsten Voraussetzungen für die Entstehung und Existenz von Leben ist.

Physikochemisch ist der UV-Spektralbereich durch die Absorption von Elektronen innerhalb der Atome und Moleküle gekennzeichnet. Zwischen 200 und 380 nm absorbieren die Elektronen in chemischen Doppelbindungen und besonders in konjugierten Doppelbindungen. Im UV-Bereich liegt auch die intensive Elektronenbande von Wasser.

Im langwelligen Bereich grenzt an das sichtbare Licht das Nahinfrarot (NIR). Es reicht von 760 nm bis 2,5 μm . Diese Abgrenzung beruht wesentlich auf der Tatsache, dass der nutzbare optische Spektralbereich (200 nm-2,5 μm) des Quarzglas hier endet, das in NIR-Spektralgeräten benutzt wird. Die Wechselwirkung der Strahlung mit den Molekülen erfolgt im NIR-Bereich über Schwingungen von Molekülen.

Als Nächstes folgt der Spektralbereich des mittleren Infrarot (MIR oder nur IR). In diesem Bereich liegen Schwingungsabsorptionen organischer Moleküle. Im Bereich des fernen Infrarot (FIR) liegen Schwingungsübergänge, die Schwingungen des Moleküls als Ganzes anregen. Gleichsam liegen in diesem Gebiet die ersten Rotationsübergänge vieler Gase.

Zur Spektraluntersuchungen der optischen Blatteigenschaften müssen informative Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischen Wellen und Pflanzenblatt gemessen werden. Die Art der Wechselwirkungen und die damit zu erkundenden Parameter wie Reflexion-, Transmission-, Absorption- und Streuprozesse werden im folgenden vorgestellt.

Reflexion

Elektromagnetische Wellen werden an Oberflächen reflektiert. Man unterscheidet zwischen:

- *spiegelnder Reflexion*: Reflexion an einer glatten Oberfläche, d.h. die Höhe der Unebenheiten der Oberfläche ist klein gegenüber der Wellenlänge des Lichtes
- *diffuser Reflexion*: Reflexion an einer rauhen Oberfläche, d.h. die Höhe der Unebenheiten der Oberfläche ist groß gegenüber der Wellenlänge des Lichtes.

Als Kriterium zur Unterscheidung zwischen spiegelnder und diffuser Reflexion gilt das Rayleigh-Kriterium: Eine Oberfläche, an der die diffuse Strahlung in alle Richtungen mit der gleichen Intensität reflektiert wurde, nennt man *Lambertsche Oberfläche* oder *Lambert-Strahler*. Wird die Strahlung nicht in alle Richtungen gleich stark reflektiert, besitzt die Oberfläche ein bidirektionales Reflexionsverhalten, das die Abhängigkeit der Intensität von den Winkeln angibt.

Transmission

Materie ist in subatomaren Partikeln konzentriert und nicht gleichmäßig verteilt. Daher liegt es nahe, daß nicht alle Lichtphotonen ein Elektron treffen, sondern daß ein bestimmter Prozentsatz der eingestrahlten Energie I_0 das Objekt ungehindert passiert. Dieser Anteil I_T wird als transmittierte Strahlung bezeichnet. Transmission (T) ist also ein Maß für die Durchlässigkeit eines Stoffes für eine bestimmte Strahlung. Im Englischen unterscheidet man zwischen linearer (transmission) und logarithmischer Darstellung (transmittance). In logarithmischer Darstellung benutzt man das Formelzeichen E (als *Extinktion* bezeichnet).

$$T = I / I_0 \qquad E = \log I_0 / I \qquad (2.1.1)$$

Absorption

Absorption ist eine Umwandlung der Strahlungsenergie in eine andere Energieform bei der Wechselwirkung mit der Materie. Absorption kann man als ein Maß der Undurchlässigkeit angeben.

Nach der klassischen Behandlung der Wechselwirkung zwischen dem elektromagnetischen Feld und elastisch gebundenen Elektronen, erhält man die Gleichung einer im isotropen Dielektrikum in x-Richtung fortschreitenden Welle:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \exp(-2\pi n k / \lambda) \exp i\omega(t - n\mathbf{x}/c) \quad (2.1.2)$$

wobei n der Brechindex, k der Absorptionsindex des Stoffes und ω die Frequenz der Oszillatoren, λ die Wellenlänge, c die Lichtgeschwindigkeit der elektromagnetischen Welle sind. Für die Intensität ergibt sich :

$$\mathbf{I}(\mathbf{x}) = \mathbf{I}_0 \exp(-4\pi n k / \lambda) = \mathbf{I}_0 \exp(-2\pi \varepsilon' / n\lambda) \quad (2.1.3)$$

darin ist $\varepsilon' = 2n^2 k$ ein Imaginärteil der Dielektrizitätskonstante: $\varepsilon = n^2 (1 - k^2)$.

Die Intensität der einfallenden Strahlung I_0 wird also durch ε' verändert. Bei Frequenzen, bei denen das System keine Resonanzenergie aufnehmen kann, ist $\varepsilon' = 0$ und $I(\mathbf{x}) = I_0$. Bei der Resonanzfrequenz besitzt ε' dagegen einen endlichen Wert und I_0 wird geschwächt. In einem Spektrum treten die Absorptionsbanden auf, wenn durch Einfluß der elektromagnetischen Strahlung die Moleküle von einem Energiezustand in einen anderen übergehen können (Resonanzübergänge). Ersetzt man in Gleichung (2.1.3) $4\pi n k / \lambda$ durch den Absorptionskoeffizient α , so erhält man nach dem Logarithmieren das *Lambertsches Absorptionsgesetz*:

$$\ln I_0 / I = \alpha x \quad (2.1.4)$$

In der Kombination mit dem *Beer'schen Gesetz* $\alpha = \mu c$ (gültig für verdünnte Lösungen, deren Lösungsmittel völlig durchlässig ist) erhält man nach Umschreiben in dekadische Logarithmen, das *Lambert-Beersches Gesetz*:

$$\mathbf{E} = \log I_0 / I = -\log T = \mu(\lambda) d c \quad (2.1.5)$$

wobei E die *Extinktion*, $\mu(\lambda)$ den *molaren Extinktionskoeffizient*, c die molare Konzentration und d die Schichtdicke darstellt. So ist die Absorption von gelösten Substanzen proportional zu ihrer Konzentration c . Somit kann man bei der gegebenen Schichtdicke die Konzentration eines gelösten Stoffes aus der Absorption bei einer Meßwellenlänge berechnen. Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz treten durch Assoziationen zwischen Molekülen oder Wechselwirkungen zwischen gelösten Substanzen und dem Lösungsmittel auf.

Absorptions- und Emissionsspektren

Sowohl Transmission als auch Absorption und Emission sind von der Wellenlänge abhängig. Deshalb beschreibt man die Absorptions- und Emissionseigenschaften einer Substanz durch ihr Spektrum. Durch Photonenabsorption im Sinne des Franck-Condon-Prinzips gelangen Moleküle, die sich bei Raumtemperatur fast ausschließlich im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes S_0 befinden, innerhalb von 10^{-15} s in verschiedene Schwingungsniveaus des angeregten Elektronenzustandes S_1 (Abb.2.1.1). Aus dem Schwingungsgrundzustand von S_1 kann das Molekül in 10^{-9} s bis 10^{-7} s durch *Lumineszenz* (L) in verschiedene Schwingungsniveaus von S_0 zurückkehren oder durch innere Umwandlung in 10^{-7} s bis 10^{-5} s und anschließende Schwingungsrelaxation strahlungslos deaktivieren. Bei der Schwingungsrelaxation wird die Energie durch Stöße in Form von Wärme abgegeben. Abbildung 2.1.1 zeigt diese Vorgänge anhand vereinfachten Energiepotentialkurven. Die resultierenden Absorptions-

und Emissionsspektren (Lumineszenz) zeigen Schwingungsstrukturen, die für S_1 und S_0 charakteristisch sind. Aufgrund der strahlungslosen Energieverluste in S_1 ist das Lumineszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum, zu größeren Wellenlängen (kleineren Frequenzen) verschoben. Die ist die sogenannte Stokes-Verschiebung und so erscheint Emissionsspektrum als Spiegelbild des Absorptionsspektrums.

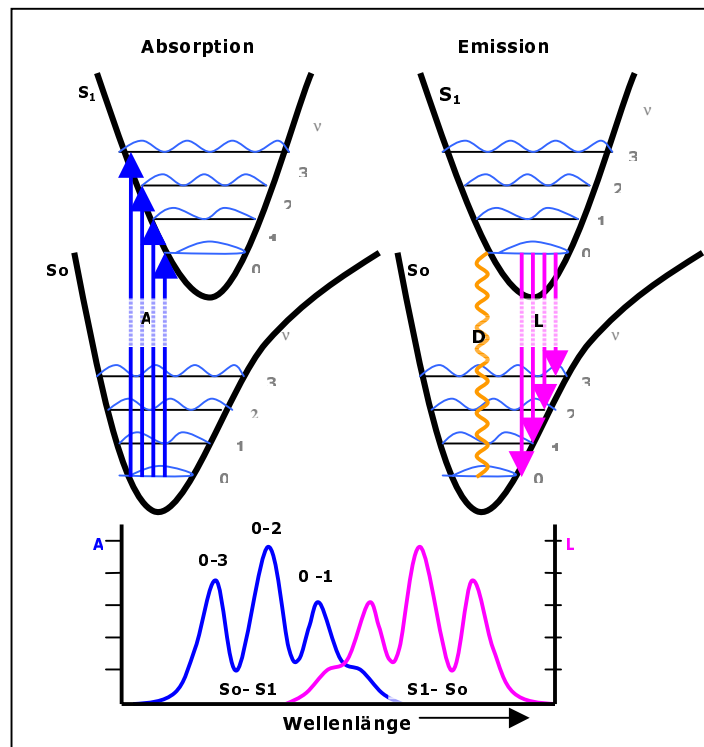


Abb.2.1.1: Vereinfachte Energiepotentialkurven mit den Wahrscheinlichkeitsdichten der Schwingungsniveaus zur Erklärung der Absorption (A) und Emission (strahlungslose Desaktivierung (De) und Lumineszenz (L)).

2.1.2. Infrarotspektroskopie

Im infraroten Bereich ist die Absorption von Strahlung mit der Anregung von Molekülschwingungen verbunden. Um die Entstehung eines IR-Spektrums verständlich zu machen, benutzt man das Modell des anharmonischen Oszillators. Seine Potenzialkurve hat asymmetrischen Verlauf und die Schwingungsniveaus haben nicht gleiche Abstände. Beim Schwingungsvorgang ändert sich die potenzielle Energie des Oszillators. Eine Molekülgruppe kann nur dann infrarote Strahlung aus einem elektromagnetischen Wechselfeld aufnehmen, wenn der damit verbundene Übergang in ein höheres Schwingungsniveau mit der Änderung des elektrischen Dipolmoments der Molekülgruppe verbunden ist. Da jeder Schwingungsübergang mit einer Änderung des Rotationszustandes des Moleküls verbunden ist, stellt das Infrarotspektrum ein Rotationsschwingungsspektrum dar, das durch die Vielzahl der Einzelabsorptionen und durch die Wechselwirkungen der Moleküle im festen oder flüssigen Zustand nicht als Linienspektrum, sondern als Bandenspektrum erhalten wird. Deshalb ist bei der Interpretation eines IR-Spektrums nicht nur die Bandenlage (Wellenlänge oder Wellenzahl) zu berücksichtigen, sondern auch die Bandenform und Intensität.

Valenz- und Deformationsschwingungen

Die Molekularschwingungen unterteilt man in Valenzschwingungen (Streckschwingung) und verschiedene Arten von Deformationsschwingungen. Bei der Valenzschwingung ändern sich die Atomabstände in Bindungsrichtung; die Schwingung erfolgt in der Kernverbindungsline. Bei den Deformationsschwingungen beruht die Schwingung auf Änderung des Bindungswinkels.

Da bei den vergleichbaren Massen der schwingenden Atome die Anregungsenergien für Bindungswinkeldeformationen wesentlich kleiner als für die Abstandsänderung in Bindungsrichtung sind, liegen die Valenzschwingungen bei höheren Frequenzen als die Deformationsschwingungen. Im allgemeinen liegen Grundtöne im MIR-Bereich und Kombinations- bzw. Obertöne im NIR-Bereich.

Während man im MIR oftmals sehr scharfe Signale beobachtet, sind die Banden im nahen Infrarot durch eine Überlagerung der Schwingungszustände deutlich breiter. Eine eindeutige Zuordnung der NIR-Banden zu bestimmten Schwingungen im Molekül ist schwierig. Trotz der genannten Problematik weist die NIR-Spektroskopie mehrere Vorteile auf, die zu einem ständig wachsenden Einsatzbereich geführt haben. So erweist es sich als vorteilhaft, daß trotz der geringen Intensität der Schwingungsobertöne noch zufriedenstellende Spektren registriert werden können. Diese charakteristischen Absorptionsfrequenzen können zur Aufklärung der Struktur und der energetischen Zustände von untersuchten Substanzen herangezogen werden. Die Anwendung multivariater Rechenverfahren, unterstützt durch die heute zur Verfügung stehenden leistungsfähigen Computer, erlaubt die exakte quantitative Auswertung von NIR-Spektren.

Ober- und Kombinationstöne

Den zur Quantenzahl $\nu=0$ gehörenden Schwingungszustand nennt man den Grundzustand (Abb.2.1.1). Neben den Grundschriftungsfrequenzen (Grundtöne) treten Oberton- und Kombinationsschwingungen (Ober- und Kombinationstöne) auf. Der Übergang von einem Grundzustand $\nu=0$ in einen Zustand $\nu=1$ ist die Grundschriftung, bei einem Übergang von $\nu=0$ in $\nu=2$ handelt es sich um die erste Oberschriftung (Oberton), die ungefähr die doppelte Frequenz aufweist. Die Wahrscheinlichkeit dieser Übergänge und damit die Intensität der Absorptionsbanden nimmt mit zunehmender Größe des Quantensprungs ab.

2.1.3. Lichtstreuung

Als Streuung wird im allgemeinen die Richtungsänderung einer elektromagnetischen Welle beim Auftreffen in Medium bezeichnet. Bei der Messung von Absorptionsspektren muß die Lichtstreuung berücksichtigt werden. Die Summe beider Effekte, Absorption und Streuung, wird in Spektroskopie als Extinktion genannt. Wenn keine Absorption und keine Reflexion vorliegen geht die Strahlung durch das Medium ungeschwächt durch. Es kann dabei aber zu einer Richtungsänderung kommen. Es gilt die Energieerhaltung:

Brechung: Durch Veränderung der Lichtgeschwindigkeit mit der Brechungsahl verändert sich bei schrägem Einfall auf eine Grenzschicht die Ausbreitungsrichtung des Lichtes.

Beugung: Durch Interferenz von Elementarwellen an kleinen Öffnungen entstehen Richtungen mit konstruktiver und destruktiver Phase. In Richtung destruktiver Phase ist die Intensität gleich Null.

Streuung: Veränderung der Ausbreitungsrichtung von Lichtwellen durch Wechselwirkung mit Teilchen. Man unterscheidet zwischen der

elastischen Streuung: die Wellenlänge der gestreuten Strahlung ändert sich nicht : *Rayleigh- und Mi- Streuung* und der

inelastischen Streuung: die Wellenlänge der gestreuten Strahlung ändert sich: *Raman- und Compton - Streuung*.

In einem dichten Medium wie z.B. einem Pflanzenblatt spielt die elastische Streuung eine wesentliche Rolle. Deswegen wird in dieser Arbeit nur diese Art der Lichtstreuung berücksichtigt. Die elastische Streuung kann stattfinden:

an einer Oberfläche: diffuse Reflexion;

an Atomen und Molekülen: *Rayleigh-Streuung*;

an Partikeln: *Mie-Streuung*.

Rayleigh-Streuung

Diese Art der Streuung, tritt dann auf, wenn das streuende Teilchen klein gegenüber der Wellenlänge des Lichtes ist. Es gilt hier die Näherung, daß der Abstand zwischen den einzelnen Molekülen so groß ist, daß eine gegenseitige Beeinflussung der Streuprozesse auszuschließen ist. Weil elektromagnetische Wellen ein äußeres Wechselfeld mit der Frequenz ν an die Moleküle anlegen, bilden Elektronen zusammen mit den Atomkernen eine *Dipolantenne*, die mit der Frequenz der einfallenden Lichtwelle schwingt und daher seinerseits eine elektromagnetische Welle abstrahlt. Die Frequenz entspricht der des einfallenden Lichtstrahles. Die hierfür benötigte Energie wird der einfallenden Lichtquelle entnommen. Für ein schwingenden Dipol ist sowohl die Abstrahlcharakteristik als auch die Intensität der Abstrahlung gut bekannt.

Der Anteil an gestreuter Strahlung ist nicht konstant, sondern hängt auch von der Wellenlänge ab. Nach dem *Rayleigh Gesetz* ist die Intensität der gestreuten Strahlung umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge λ^{-4} . Somit ist der Anteil der gestreuten Strahlung im kurzwelligen Bereich bei weitem höher als im langwelligen. Die Streucharakteristik hängt mit dem Streuwinkel φ wie folgt proportional $1+\cos^2\varphi$. Die Rayleigh-Streuung geschieht bevorzugt in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung also in Richtung des einfallenden Lichtstrahls und 180 Grad dazu (Abb.2.1.2). Dabei findet auch eine streuwinkelabhängige Polarisierung des Lichtes statt: Licht, das unter 90° gestreut wurde, ist vollständig senkrecht zur Streuebene polarisiert.

Mie-Streuung

Sie findet an Streuzentren statt, die gleich oder größer als die Wellenlänge des Lichtes sind (1-10 μm). Große Teilchen sind aus vielen einzelnen Dipolen zusammengesetzt, deren Emission sich überlagert. Dies führt zu Interferenzerscheinungen, so daß sich je nach Lokalisation der kohärenten Strahler am Teilchen die Sekundärwellen gegenseitig verstärken oder auslöschen. Die Intensität der Streuung ist somit nicht mehr primär von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes sondern vielmehr vom Verhältnis der Wellenlänge zur Teilchengröße abhängig. Dadurch entsteht ein komplexer Streumechanismus, der von der Teilchengröße und -Form abhängt. Die Intensitätsverteilung der an einem Teilchen erzeugten Mie-Streuung ist vom Streuwinkel abhängig. Mie-Streuung findet in Vorwärtsrichtung statt, mit einem kleinen seitlichen und rückwärtigen Anteil (Abb.2.1.2). Die Wellenlängenabhängigkeit ist schwächer als im Falle der Rayleigh-Streuung, aber wesentlich komplizierter, da sie von der Größe, der Form und gegebenenfalls auch dem Brechungsindex der Partikel abhängt. Dasselbe gilt für die Polarisierungseigenschaften.

Bei der obigen Art der Darstellung im Form eines Polardiagramms (Abb.2.1.2) kommt die winkelabhängige Verteilung der gestreuten Lichtintensität besonders gut zur Geltung. Die Streuungsintensität, die einem Winkel zugeordnet ist läßt, sich leicht dadurch

feststellen, daß man vom Ursprung des Koordinatensystems ausgehend eine Gerade im gefragten Winkel mit der Kurve schneidet. Der Abstand des Schnittpunktes zum Ursprung gibt die anteilmäßige Menge des in diese Richtung gestreuten Lichtes an.

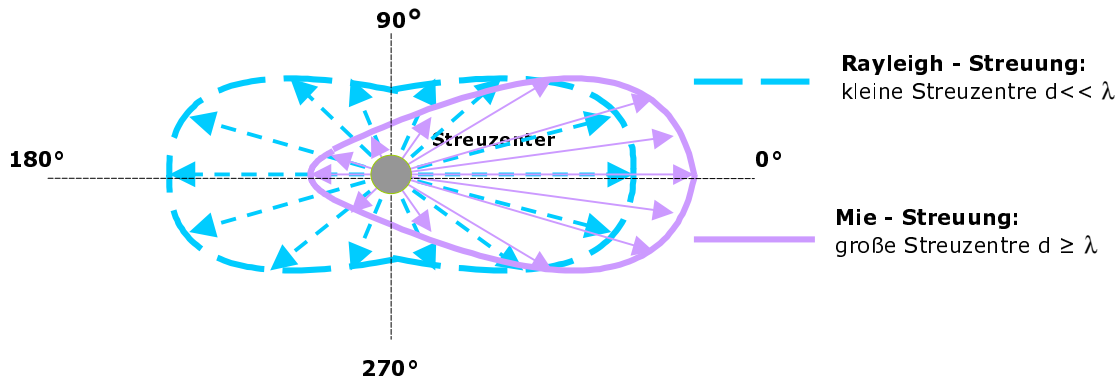


Abb.2.1.2: Polardiagramm der Intensitätsverteilung des gestreuten Lichtes in Abhängigkeit des Winkels für Streuzentren unterschiedlicher Größe.

Nicht-selektive und mehrfache Lichtstreuung

Nicht-selektive Streuung tritt auf, wenn Strahlung mit den Streuzentren zusammentrifft, deren Durchmesser deutlich größer als die Wellenlänge der Strahlung ist (10-100 μm). Bei größeren Partikeln gilt die von Mie entwickelte Theorie zwar auch noch, es ist aber einfacher die Streuung durch die geometrische Optik (Brechung, Reflexion) zu beschreiben.

In einem dichten heterogenen Medium kommen Rayleigh-, Mie- und nicht-selektive Streuung gemeinsam vor und das einfallende Licht wird diffus in alle Richtungen gestreut, wobei die Größe der vorhandenen Streuzentren festlegt, welche Art der Streuung überwiegt. Bei ansteigendem Durchmesser der Streupartikeln überwiegt die Mie-Streuung immer mehr und der prozentuelle Anteil des nach vorne gestreuten Lichtes nimmt zu. In dichten strukturierten Objekten wie Pflanzenblättern findet komplizierte Art der mehrfachen Lichtstreuung (MLS) statt, die als Resultat der mehrfachen Streuung-, Reflexion- und Brechung-Prozesse an Blattstrukturen und Komponenten beschrieben werden kann.

2.2. Physikalische Eigenschaften des Wassers

Wasser ist für die Pflanzen in vielen Belangen und auf vielen Organisationsebenen ein ganz entscheidender abiotischer Faktor. In diesem Kapitel wird deshalb der Wasser-Substanz, Aufbau des Wassermoleküls und die Strukturen der Wasserphase näher beschrieben. Mit diesen Grundwissen ist es leichter, die physikalischen Eigenschaften flüssigen Wassers besser zu verstehen, die seine Bedeutung sowohl allgemein in der unbelebten Natur als auch speziell für die Pflanzen bedingen.

Wasser nimmt unter allen vergleichbaren Substanzen eine Ausnahmestellung ein. Diese ist in seinen physikalischen Eigenschaften begründet, die in vielerlei Hinsicht einzigartig sind. Die Eigentümlichkeit läßt sich direkt aus der Struktur des H_2O -Moleküls verstehen. Ein besonderes Strukturelement dieses kovalenten Wasserstoffoxides ist seine Fähigkeit, die starken Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können.

2.2.1. Struktur des Wassermoleküls

Wasser ist das einzige natürlich vorkommende flüssige anorganische Oxid. Sein chemischer Name müßte als Diwasserstoffmonoxid bezeichnet werden, vereinfachend sprechen wir aber von Wasser. Die in mancher Hinsicht anomalen Eigenschaften des Wassers lassen sich auf die Struktur des H_2O -Moleküls zurückführen. Das Wassermolekül ist ein Atomverband aus zwei Wasserstoff- und einem Sauerstoffatom. Sauerstoff, ein Element der Gruppe VI des Periodensystems besitzt mit seine acht Elektronen die folgende Konfiguration $1s^2 2s^2 2p^4$. Bei Besetzung der einzelnen Atomorbitale nach der *Hundschen* Regel können je zwei einfach besetzte p-Orbitale des Sauerstoffatoms bei richtiger räumlicher Orientierung mit je einem s-Atomorbitale eines Wasserstoffatoms überlappen. Die dabei entstehenden bindenden sp-O-H-Molekülorbitale sollen einen idealen Winkel von 90° zueinander aufweisen. Die vier verbleibenden freien nicht-bindenden Elektronen wären auf die 2s- und. 2p-Atomorbitale verteilt. Messungen zeigen jedoch, daß der Bindungswinkel zwischen H-O-H in Wirklichkeit $104,5^\circ$ beträgt (Abb.2.2.1).

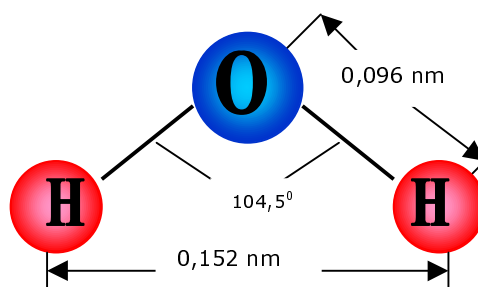


Abb.2.2.1: Aufbau des Wassermoleküls.

Weil eine höhere Elektronendichte am Sauerstoffatom als an den beiden Wasserstoffatomen herrscht, weist also das Molekül zwei Pole verschiedener Elektronendichte auf, die permanent sind. Das Wassermolekül ist damit ein permanenter Dipol. Bedingt durch die hohe Elektronendichte am Sauerstoffatom und der starke Abstoßung der freien, nicht an einer Bindung beteiligten Elektronenpaare, ist das Wassermolekül gewinkelt.

In der Elektronendichteverteilung überlappen sich die p-Orbitale des Sauerstoffatoms mit den s-Orbitalen der Wasserstoffatome zu s-Bindungen, etwa wie die Darstellung des

Molekülorbitale zeigt (Abb.2.2.2.). Die heutige Vorstellung nach dem Elektronenpaar-Abstoßungsmodell von *Gillespie und Nyholm* besagt, daß die 8 Elektronen der äußeren Schale paarweise angeordnet sind. Diese Elektronen befinden sich in keulenförmigen Räumen mit einer Wahrscheinlichkeit von 98%. Im Raum gesehen bilden die Keulen ein Tetraeder mit einem Tetraederwinkel von 109° . Infolge von elektrostatischen Effekten kommt es aber zu einer Abweichung zu $104,5^\circ$.

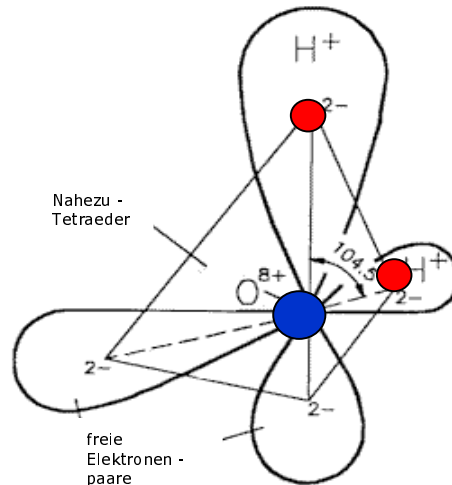


Abb.2.2.2: Molekülorbitale von Wasser.

Wasserstoffbrückenbindungen

Wasserstoffbrücken (H-Brücken) spielen in der Natur eine besondere Rolle. Wasserstoffbrücken sind für Lebensvorgänge von weitreichender Bedeutung. Man findet Wasserstoffbrücken zwischen Atomen mit hoher Elektronegativität (meistens, Sauerstoff (O), Stickstoff (N); Fluor (F)) oder Bereichen mit hoher Elektronendichte (π -Systeme). Es handelt sich hierbei um schwache, gerichtete Bindungen. Ihre außergewöhnliche Bedeutung in biologischen Systemen erhalten sie dadurch, daß sie bei Raumtemperatur leicht geöffnet und neu geknüpft werden können, wodurch z.B. Enzymreaktionen und Proteinfaltung erst möglich werden. Auch die besonderen Eigenschaften von Wasser stammen von H-Brücken. Die Bindungsenergie von H-Brücken wird im Normalfall von den elektrostatischen Kräften dominiert. Eine Wasserstoffbrücke ist kürzer als die Summe der van-der-Waals Radien der beteiligten Atome. Die X-H Bindung wird immer länger, je stärker die Wasserstoffbrücke ist. Dieses macht Wasserstoffbrücken zu idealen Studienobjekten für die Infrarot-Spektroskopie: Die Bindungsverlängerung und -schwächung führt zu einer Verringerung der X-H Streckschwingungsfrequenz, das heißt zu einer charakteristischen Rotverschiebung im Infrarotspektrum [Djafari 1997].

Im gasförmigen Zustand konnte man für ein solitäres H_2O -Molekül eine O-H-Bindungslänge von 96 pm bestimmen, in flüssigem oder festem Wasser beträgt diese dagegen 99 pm. Dieser Veränderung der Bindungslänge liegt die Ausbildung von *Wasserstoffbrücken* und die hinaus folgenden physikalischen Eigenschaften des Wassers machen das Leben auf der Erde in der existenten Form eigentlich erst möglich.

Eine Wasserstoffbrückenbindung liegt dann vor, wenn ein H-Atom an zwei oder mehrere elektronegative Atome gebunden ist. Nach dem *Donator-Akzeptor-Modell* stellt ein *Photonendonator* O-H, in dem der Wasserstoff an ein stark elektronegatives Sauerstoffatom gebunden ist, einem *Photonenakzeptor* sein H-Atom teilweise zur Verfügung.

Am einfachsten läßt sich die Natur der H-Brückenbindung (O-H---X) durch die rein elektrostatische Anziehung zwischen dem positivierten H-Atom des O-H-Donators und der hohen negativen Ladungsdichte am X-Akzeptor, im Wasser also dem Sauerstoff eines benachbarten Wassermoleküls, erklären. Durch elektrostatische Wechselwirkung mit dem Akzeptoratom wird die kovalenten O-H-Bindung im Addukt O-H --- O geweitet. So kommt es, verglichen mit isolierten H₂O-Molekülen im Gas, zu unterschiedlichen Bindungslängen. Die Adduktbindungslänge H --- O selbst ist deutlich größer als die der O-H-Bindung und beträgt 177 pm. Die O-H --- O-Bindung ist unsymmetrisch (Abb.2.2.3).

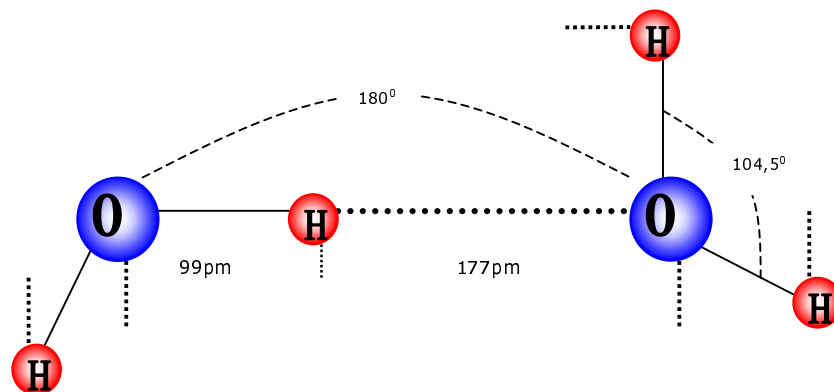


Abb.2.2.3: Wasserstoffbrückenbindung, Bindungslängen und -winkel zwischen zwei H₂O-Molekülen.

Damit "lagert" das Sauerstoffatom einen Teil seiner Ladungsdichte quasi auf H-O-Bindung eines benachbarten Wassermoleküls aus. Durch die mit der verstärkten Delokalisation der Elektronen verbundene "Ausweitung" werden größere Realisationsräume geschaffen und somit die Bindung stabilisiert. Eine Wasserstoffbrückenbindung entspricht einer Bindungsenthalpie von $20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Fähigkeit der Wassermoleküle zur Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken ($2 \cdot 20 = 40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) führt zu ungewöhnlich hohen Schmelz- und Siedepunkt im Vergleich zu anderen Chalkogenwasserstoffe (H₂S, H₂Se, H₂Te). Ohne diese zwischenmolekulare Kräfte würde Wasser unter Standardbedingungen bei 173 K (-100°C) schmelzen und bei 198 K (-75°C) und nicht bei 373 K (100°C) sieden. Die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbindung bedingt auch andere anomale Eigenschaften des Wassers, sowie seine Strukturordnung in festem (Eis) und flüssigem Zustand.

2.2.2. Struktur von flüssigem Wasser

Wie jeder Stoff kommt Diwasserstoffmonoxid in drei Aggregatzuständen vor: als Feststoff (Eis), als Flüssigkeit (Wasser), als Gas (Wasserdampf). Wobei ist die Bezeichnung Gas aus der Sicht der Physik falsch. Ein Dampf ist ein heterogenes Gemisch aus einer kondensierten Flüssigkeit, die als feine Tröpfchen verteilt in einem Gas (also z.B. in Luft) vorliegen.

Bei niedrigen Temperaturen nimmt die Wärmebewegung ab. Unter 0°C überwiegt die Elektrostatik, und es bildet sich eine feste Struktur im Eiskristall aus. Abhängig vom Druck, unter dem Wasser auskristallisiert, können verschiedene Modifikationen von Eis auftreten. Zum Beispiel in der Kristallstruktur von sogenannten Eis-I sind die Sauerstoffatome in einem gewellten Sechsring angeordnet. Jedes Sauerstoffatom ist tetraedrisch von den O-Atomen von vier benachbarten Wassermolekülen umgeben. Die

Sauerstoffatome selbst sind in diesem Gitter durch unsymmetrische Wasserstoffbrücken verbunden.

Cluster- und Makromolekül-Modell des Wassers

Wasser besitzt nicht nur im festen, sondern auch im flüssigen Zustand eine hochgeordnete, Struktur. Auch heute ist Struktur des flüssigen Wassers nicht in allen Einzelheiten erforscht. Aus quantenmechanischen Berechnungen und den Ergebnissen von Untersuchungen mittels Röntgen- und Neutronenbeugung, IR- und Raman-Spektroskopie wurden die *Kontinuum-* und *Mischungsmodelle* für die Wasserstruktur abgeleitet [Brutschy 1988, Riehn 1992]. Letzteres nennt man auch *Cluster-Modell*. Die Fähigkeit der Wassermoleküle zur Wasserstoffbrückenbindung führt zu einer elektrostatischen Anziehung zwischen einzelnen Molekülen und zur Bildung von kettenförmigen Aggregaten - Clustern. *Cluster* ist eine andere Bezeichnung für Assoziat. Das Clustermodell nimmt an, daß durch die Wasserstoffbrückenbildung entstandene und zusammengehaltene Aggregate einer eisanalogen Struktur einzelne ungebundene Wassermoleküle auf Zwischengitterplätzen enthalten. Wegen dieser besonderen Struktur kann flüssiges Wasser eher als "flüssiges" Eis aufgefaßt werden. Sehr grob vereinfacht könnte man sagen, daß nach dem Eisschmelzen in flüssigem Wasser eine quasi-kristallische Struktur weiter herrscht.

Die quasi-kristallische Gitter sind unvollkommen und auf gewisse Bereiche beschränkt. Sie sind weiterhin nicht statisch, sondern zerfallen in einem dynamischen Prozeß und bilden sich neu. Ständig werden Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen gebildet und auch wieder gebrochen. Der Höhepunkt der Clusterbildung liegt bei $+4^{\circ}\text{C}$. Bei höheren Temperaturen ist die Molekülbewegung infolge der Wärme größer, so daß sich nur kleinere Cluster bilden können. Je höher die Temperatur ist, desto kleiner sollen die geordneten Bereiche sein und desto schneller sollten die Auf- und Abbauprozesse ablaufen. Bei siedendem Wasser gibt es schließlich keine Cluster mehr.

Makromolekülmodell

Im Wasserdampf sollen z.T. Dimere $(\text{H}_2\text{O})_2$ und kleine Molekülaggregate $(\text{H}_2\text{O})_n$ ($2 < n < 6$) vorliegen [Barth 1998]. Nur im gasförmigen Zustand existieren tatsächlich einzelne diskrete H_2O -Moleküle. Im flüssigen Wasser gibt es kaum noch isolierte Wassermoleküle, sondern daß Wasser ist eigentlich ein großes Molekül aus vielen einzelnen Wassermolekülbausteinen, ein "Makromolekül". Somit dürfte die Summenformel des flüssigen Wassers auf keinen Fall als " H_2O " angegeben werden. Sie müßte wegen der Clusterbildung eigentlich $(\text{H}_2\text{O})_n$ lauten. Dabei kann n sehr große Werte (>700) annehmen.

Die Cluster-Konstellation dauert im allgemeinen sehr kurz (10^{-9}s). Mittels modernster Spektalmethoden lassen sich aber trotzdem Muster entdecken, die stabile Clusterstrukturen bilden. [Brutschy 1988, Riehn 1992]. Die Schwingungsspektren geben Auskunft über die Größe und die Bindungsverhältnisse der einzelnen Cluster. Bei Ionen-Molekül Reaktionen kann man bestimmen, ab welcher Clustergröße eine Reaktion stattfindet. Der Vergleich mit *ab initio*-Rechnungen erlaubt darüber hinaus die Bestimmung der geometrischen Strukturen der Cluster und der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen [Buchhold 2000]. Die Forschern benennen unstrukturierten und strukturierten Formen mit Wasser I+II, wobei Wasser II die stabilere Variante ist. Seine Struktur liegt um den Faktor 20 höher, als bei dem unstrukturiertem Wasser I. Das Verhältnis beider Formen gibt den Reifegrad des Wassers an. Je mehr Wasser II vorhanden ist, um so reifer ist das Wasser.

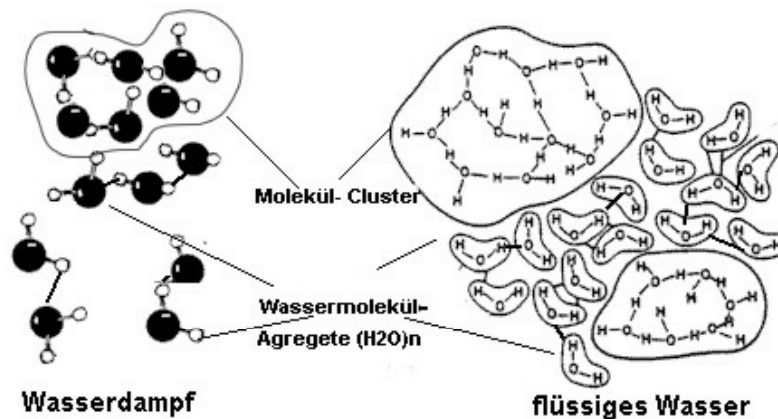


Abb. 2.2.4: Koexistenz von Molekülverbänden: Cluster und $(\text{H}_2\text{O})_n$ Moleküle wechselnder Größe und Lebensdauer im Wasserdampf und flüssigem Wasser.

Cluster sind keinem der drei Aggregatzustände (fest, flüssig, gasförmig) zuzuordnen und nehmen einen eigenen geordneten, kondensierten Zustand ein. Cluster verfügen meist über eine genau definierte Struktur und Zusammensetzung. Cluster ermöglichen die gezielte Untersuchung der zwischen den Teilchen wirkenden schwachen zwischenmolekularen Wechselwirkungen: Am wichtigsten sind hierbei Wasserstoffbrücken, elektrostatische (dipolar und multipolar) und Dispersionswechselwirkungen (van-der-Waals). Diese außergewöhnlichen Eigenschaften machen sie zu interessanten Untersuchungsobjekten für spektroskopische und theoretische Studien. IR-Spektren ermöglichen es verschiedene Clustergrößen zu unterscheiden und daraus Informationen über Clusterstrukturen und die Bindungsverhältnisse zu gewinnen [Djafari 1997].

2.2.3. Einige bio-physikalische Eigenschaften von Wasser

Wasser ist Lebenselixier. Es bestimmt als Reaktionsmedium mit seinen speziellen und einzigartigen Eigenschaften alle Lebensvorgänge. Die intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen bestimmen physikalische, biochemische und somit auch die physiologische Eigenschaften von Wasser. Wasserstoffbrücken beeinflussen Strukturen und Eigenschaften von organischen Molekülen, insbesondere von Biopolymeren wie DNA, Proteine und Polysaccharide. Erst in wässrigen Lösung können solche Moleküle biochemische Funktionen im Stoffwechsel ausüben, z.B. als Enzyme, als Gene, als Stützgewebe.

Eine Reihe von Eigenschaften heben das Wasser aus der Gruppe der Wasserstoffverbindungen der dem Sauerstoff benachbarten Elemente heraus: Während alle Wasserstoffverbindungen Gase sind, ist Wasser als einzige flüssig. Damit ist Wasser die einzige anorganische Flüssigkeit auf der Erde. Während viele dieser „Hydride“ toxisch sind, ist Wasser der Hauptbestandteil des Lebens. Die für Pflanzenphysiologie wesentliche Wasserkenndaten und ihre ursächliche Erklärung werden in folgenden kurz vorgestellt.

Lösungsvermögen

Lebensnotwendige Rolle des Wassers beruht auf seine Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Diese sind nicht nur zu anderen Wassermolekülen möglich, sondern auch zu polaren Gruppen (z.B. -OH; -NH₂) anderer Moleküle, die sich im Wasser lösen. Besonders wichtig ist das hohe Lösungsvermögen von Wasser für Verbindungen, die aus polaren Molekülen (z.B. Zucker) oder aus Ionen (z.B. Salze) aufgebaut sind,

welche für physiologischen Vorgänge von großer Bedeutung sind. Die bei der Auflösung des Molekül- bzw. Ionengitters (Salz) aufzubringende Energie wird durch die Stabilisierung der gelösten Moleküle über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen H_2O und den polaren Gruppen des Zuckermoleküls bzw. durch die Hydratation der Ionen erbracht.

Zellen nehmen Wasser einerseits durch *Quellung* und andererseits durch *Osmose* auf. Die Ursache für die beiden Prozesse liegt im Gefälle des chemischen Potentials des Wassers, welches unter physiologischen Bedingungen in der Zelle meist negativ ist.

Osmose

Osmose ist die Bewegung von Wassermolekülen durch eine selektiv permeable Membran. Konzentrations- und Druckdifferenzen treiben die Osmose, die abhängt im wesentlichen von der Konzentration des gelösten Stoffes und weniger von der Art der gelösten Teilchen. Befindet sich die höher konzentrierte Lösung in einem abgeschlossenen System, so wird durch die Diffusion des Lösungsmittels allmählich ein hydrostatischer Überdruck erzeugt, der dem Verdünnungsbestreben entgegenwirkt. Diesen manometrisch meßbare Druck wird als *osmotischen Druck* bezeichnet.

Kohäsion

Bindungsenthalpie einer Wasserstoffbrücke zwischen Wassermolekülen mit etwa 20 kJ/mol ist als gering anzusehen, verglichen mit den 450 kJ/mol der kovalenten O-H-Bindung im H_2O Molekül. Natürlich gibt es in jeder Flüssigkeit verschiedenartige Wechselwirkungen (z.B. Dipol-Dipol). Die Bindungsenthalpie dieser Wechselwirkungstypen liegt jedoch wesentlich niedriger als die der Wasserstoffbrücken. Die Summe aller Wechselwirkungskräfte nennt man als *Kohäsionskräfte*. Verglichen mit reinen Stoffen ähnlicher Struktur sind diese im Wasser sehr groß und bedingen so seine Sonderstellung.

Adhäsion

Unter Adhäsion versteht man die Summe der gegenseitigen anziehenden Wechselwirkungen zwischen den Molekülen verschiedener Stoffe, z. B. einer Flüssigkeit und einem Festkörper.

Oberflächenspannung

In Inneren einer Flüssigkeit wirken alle Kohäsionskräfte gleichmäßig auf Atome oder Moleküle, bzw. von diesen auf benachbarte Teilchen. Dabei kompensieren sich die Kräfte vollständig. Anders ist die jedoch an einer Grenzfläche. Die Grenzflächenmoleküle sind von tiefer in der flüssigen Phase liegenden Moleküle beeinflusst. Diese versuchen sie in die Flüssigkeit zu ziehen. Die molarefreie Enthalpie der Teilchen in der Grenzfläche ist deshalb größer als in der Flüssigkeit. Diese, auf die Grenzflächenmoleküle wirkende, in die Flüssigkeit gerichtete Kraft wird Oberflächenspannung genannt. Wasser aufweist die größte Oberflächenspannung ($7,2 \cdot 10^{-2}$ N/m) unter vergleichbaren Flüssigkeiten. Diese ist eine Folge der hohen Kohäsionskräfte. Oberflächenspannung und Adhäsion bewirken z.B. Anziehung zwischen Wasser und Zellwand.

Kapillarität

Direkt mit der Oberflächenspannung hängt die Erscheinung der Kapillarität zusammen. In einem engen Rohr, dessen Innenraum von Wasser vollständig benetzt wird, steigt diese solange hoch, bis das Gewicht der Flüssigkeitssäule der aus dem Bestreben zur Oberflächenverringerung resultierenden Kraft gleich ist. Dies ist von großer Bedeutung für die Pflanzenphysiologie: Kapillaranstieg von Wasser in Pflanzenleitbahnen; Nichtabreißen der kapillaren Wasserfäden in den Wasserleitungsbahnen von Pflanzen; Eindringen von Wasser in die Kapillarstrukturen von Pflanzenzellen und -geweben. Beispielsweise wird in einem Xylemgefäß vom Radius 25 μm ein kapillarer Anstieg von 0,6 m bewirkt. Zellwandkapillaren sind noch weitaus dünner 10 μm .

Photolyse

Durch Elektrolyse läßt sich Wasser in seine Bestandteile zerlegen, wobei sich an der Kathode Wasserstoff und an der Anode Sauerstoff im Verhältnis 2:1 abscheiden. Photochemisch läßt sich Wasser zwar nicht durch sichtbares Licht, aber durch sehr kurzwellige Ultraviolettstrahlung in H_2 und O_2 spalten. Auf dem Umweg über Sensibilisatoren wie Chlorophyll und andere Photopigmente ist die Photolyse von Wasser die umsatzstärkste chemische Reaktion auf Erden, nämlich als Photosynthese oder Assimilation.

Verdampfungswärme

In den Clustern sind einzelne Wassermoleküle weniger beweglich und es wird vergleichsweise viel Energie benötigt, um die freie Beweglichkeit wieder herzustellen, das heißt Wasser zu verdampfen. Deshalb hat Wasser eine sehr hohe Verdampfungswärme. Es benutzen die Pflanzen bei der Transpiration, um die Temperaturregulation zu leisten und um die Photosynthese sowie andere physiologische Vorgänge zu ermöglichen. Transpiration bewirkt kompletten Wasseraustausch im Blatt (an einem warmen, trockenen Tag) in etwa einer Stunde.

Gefrierpunktserniedrigung und Siedepunktserhöhung

Durch im Wasser gelöste Verbindungen wird das Wasser gewissermaßen verdünnt, so daß im Mittel weniger H_2O -Moleküle aus der Wasseroberfläche austreten und damit bei gegebener Temperatur der Dampfdruck geringer ist als in reinem Wasser. Diese führt zu einer Gefrierpunktserniedrigung und Siedepunktserhöhung. In organischen Lösungsmitteln läßt sich Wasser durch Unterkühlung bis ca. -20° flüssig halten, als Tropfen in organischen Lösungen sogar bis ca. $-40^\circ C$.

Wesentliche Eigenschaften vom Wasser sind noch unerforscht

Bis heute bleiben viele Fragen von Wassereigenschaften nicht erklärt und unerforscht. Besonders ist seine Rolle für die Struktur, Dynamik und Funktion biomolekularer Systeme und hydratisierter Biomoleküle weitgehend unverstanden. Ebenfalls über die Eigenschaften und die Funktion von Wasser an Grenzflächen, wie großen Biomolekülen (z.B. Protein-, Membranoberflächen), ist noch wenig bekannt.

Zeitweilig erregte sogenanntes *Polywasser* (auch als *anomales Wasser*, *Superwasser* oder *Derjagin-Wasser* bezeichnet) Interesse, eine „Wasser-Modifikation“ mit seltsamen Eigenschaften, deren Existenz noch nicht geklärt werden konnte. Zum Beispiel läßt sich *Polywasser* durch Unterkühlung bis ca. -70° flüssig halten.

Verhalten von Wassermoleküle in Poren und Kanälen von Zellen ist noch unerforscht. Dort haben sie nur wenig Platz und zeigen deshalb unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Wänden. Die Struktur und Dynamik des Wasser ist daher dort anders, als man sie von der Flüssigkeit her kennt. Noch viele andere Fragen stehen vor den Forschern. Spektroskopische Methoden sind dabei die zuverlässigsten Sensoren von den Wechselwirkungen der Wassermoleküle mit der Umgebung. Langsame Bewegungen studiert man mit speziellen Methoden der Kernspinresonanz (NMR), die schnelle Dynamik mithilfe der Raman- und Infrarotspektroskopie.

2.2.4. Spektroskopie von Wasser

Das Wassermolekül besteht aus drei Atomen ($N=3$) und hat somit drei Schwingungsfreiheitsgrade und drei klassische Frequenzen laut der Auswahlregel der Quantenmechanik. Abbildung 2.2.5 zeigt die drei möglichen Vibrationen des Wassermoleküls in gasförmiger Phase und die dazugehörigen Frequenzen. Die entsprechenden Schwingungsarten und die Wellenzahlen sind nach [Engelke 1985]:

$\nu_1=3657\text{cm}^{-1} \Rightarrow \lambda_1 = 3.106 \mu\text{m}$ Valenzschwingung = symmetrische O-H Streckung

$\nu_2=1595\text{cm}^{-1} \Rightarrow \lambda_2 = 6.08 \mu\text{m}$ Deformationschwingung = H-O-H Beugung

$\nu_3=3756\text{cm}^{-1} \Rightarrow \lambda_3 = 2.903 \mu\text{m}$ Valenzschwingung = asymmetrische O-H Streckung

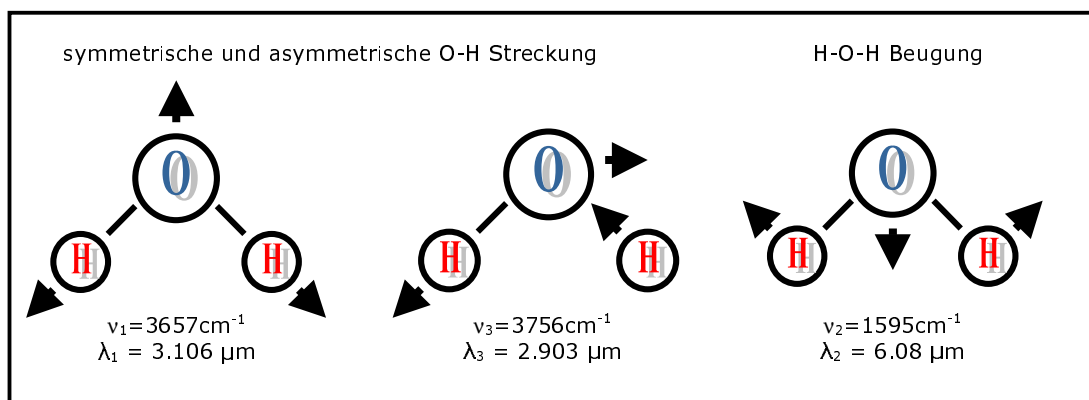


Abb.2.2.5: Vibrationen des Wassermoleküls und entsprechende Frequenzen.

Im Bild oben sind links die symmetrische und asymmetrische O-H-Streckschwingungen dargestellt, die durch die Änderung der Valenzbindungslänge hervorgerufen werden. Rechts im Bild ist eine Deformationschwingung gezeigt, die durch H-O-H Beugung, das heißt durch die Winkeländerung des Wassermoleküls, verursacht wird.

Moleküle, die ein Dipolmoment besitzen, lassen sich per IR-Strahlung zu Schwingungen anregen. Beim Wasser ist bereits ein Dipolmoment vorhanden, das sich durch die Schwingungsanregung ändert. Symmetrische und antisymmetrische Valenzschwingungen (Valenzmode) des Wassermoleküls könnte man in IR Spektren vom Wasserdampf gut unterscheiden und ihre Frequenzen sind $\nu_1=3657$ und $\nu_3=3756 \text{ cm}^{-1}$. Tabelle 2.2.2. zeigt Vibrationsniveaus des H_2O -Moleküls im Wasserdampf. [Asrar 2000]

In flüssigem Wasser werden diese Wellenzahlen allerdings nicht gefunden. Im Raman Spektrum des flüssigen Wassers wird für ein Peaks bei etwa 3400 cm^{-1} ($\lambda=2941 \text{ nm}$) registriert, bestehend aus zwei unterschiedlich intensiven Gaussfunktionen mit Maxima bei etwa 3200 cm^{-1} und 3420 cm^{-1} . Die Frequenzen der Valenzschwingungen werden bei dem Übergang zum flüssigen Aggregatzustand, das heißt bei der Bildung des Netzes der Wasserstoffbrückenbindungen, wesentlich herabgesetzt. Zudem ist eine Temperaturabhängigkeit der Funktionen festzustellen, die von der Peaks-Intensität bei 3200 cm^{-1} abhängt. Die Frequenz dieser Mode nimmt bei der Temperatursenkung und beim Übergang zu dem festen Zustand (Eis) ab. Im IR Spektren des flüssigen Wassers unter Standardbedingungen wird eine Valenzmode $\nu_{\text{OH}}=3420 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda=2,924 \mu\text{m}$) ($\nu_{\text{OH}}=\nu_1+\nu_3$) registriert und Deformationsmode ν_2 beträgt 1642 cm^{-1} ($\lambda=6 \mu\text{m}$) (Abb.2.2.6). Diese Mode hat die kleinere Halbbreite und niedrigere Intensität im Vergleich zum Valenzband.

Alle fundamentale Schwingungen, ihre Obertöne und ihre Kombinationstöne sind von den Auswahlregeln erlaubt und sind in den IR Absorptionsspektren zu beobachten (Abb.2.2.6).

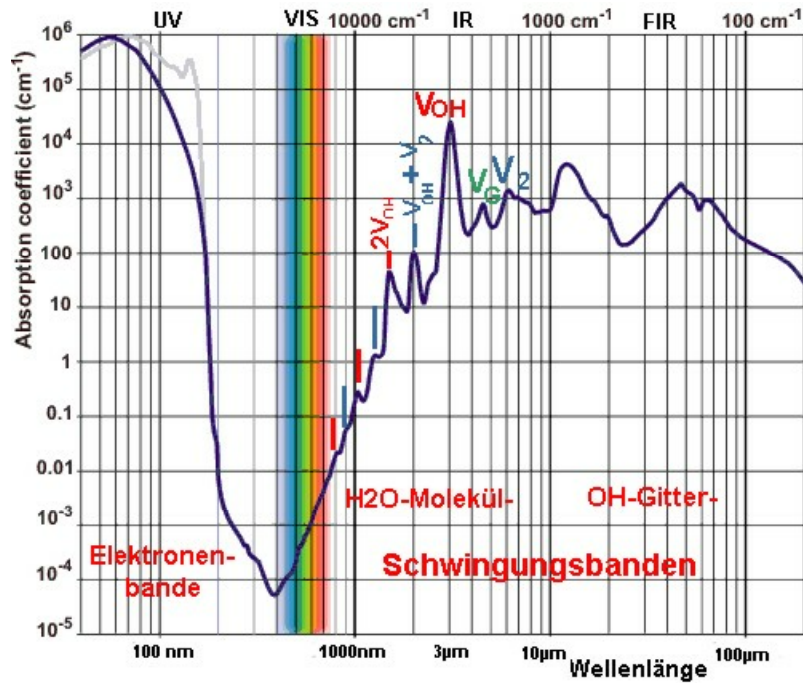


Abb.2.2.6: Elektronen-Schwingungsspektrum vom flüssigen Wasser.

Das Wasserabsorptionsspektrum ist in Abb.2.2.6. im breiten Spektralbereich dargestellt [Carleer 1999]. Im Ultraviolett ist Wasserabsorption durch Elektronenübergänge bedingt und ist deutlich intensiv. Im VIS Bereich liegt das Absorptionsminimum vom Wasser. Danach steigt die Wasserabsorption wieder an und erreicht ihr Maximum im MIR Bereich bei etwa 2940 nm. Darauf fallen die Werte wieder etwas ab, wobei die Absorptionskoeffizienten jedoch bis ins ferne Infrarot relativ hoch bleiben. Im IR Spektrum sieht man einige scharfe Schwingungsfrequenzen (ν_{OH} , $2\nu_{OH}$), die im Bereich von OH-Streckschwingungen liegen. Eine Kombinationsschwingung ist z.B. $\nu_{OH} + \nu_2$ deren Wellenlänge sich mit $1/\lambda = 1/\lambda_{OH} + 1/\lambda_2$ zu $1.87 \mu\text{m}$ ergibt. Ein Beispiel für eine Oberschwingung ist $2\nu_{OH}$, die einer Wellenlänge von $1.45 \mu\text{m}$ entspricht. Nur wenige Kombinationen von Materialien haben so hohe Fundamentalfrequenzen, daß im NIR beobachtet werden. Eine Ausnahme ist die Streckung des OH-Radikals, das z.B. in H_2O bei $\nu_{OH} = 2.94 \mu\text{m}$ zu spektralen Maximum führt.

Das Absorptionsspektrum im VIS Bereich ist durch schwache Maxima charakterisiert, die als höhere Kombinations- und Obertöne erläutern werden kann.

Um die Abweichung der beobachteten IR Absorptionsbanden des flüssigen Wassers von solchen für Wasserdampf (Tab.2.2.1) theoretisch zu erklären, beschreiben W. Murphy und H. Bernstein [Murphy 1972] ein Modell für Wasser, in dem angenommen wird, daß sich ein Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen mit 4 weiteren Wassermolekülen verbindet. Diese Änderungen im Absorptionsspektrum des flüssigen Wassers könnte man auch mit dem Cluster-Modell erläutern. Jedoch nicht immer ist die Zuordnung eines gemessenen IR Spektrums zu einer spezifischen Clusterstruktur eindeutig. In diesen Fällen bietet sich der Vergleich des experimentell gemessenen Spektrums mit den Ergebnissen aus theoretischen Rechnungen an [Bach 2000].

Wellenlänge (μm)	Wellenzahlen (cm^{-1})	Schwingungs- und Deformationsmode
6.270	1595	ν_2 - Deformationsmode
3.173	3152	$2\nu_2$ - Deformationsoberton
2.738	3652	ν_1 - Valenzmode
2.662	3756	ν_2 - Valenzmode
1.876	5331	$\nu_1 + \nu_2$ Kombinationsmode
1.440	8807	$2\nu_1$ - erster Oberton
1.135	8807	$\nu_1 + \nu_2 + \nu_3$ Kombinationsmode
0.942	10613	$2\nu_1 + \nu_3$ Kombinationsmode
0.906	11032	$3\nu_3$ zweiter Oberton
0.823	12151	$2\nu_1 + \nu_2 + \nu_3$ Kombinationsmode

Tab 2.2.1.: Die wesentlichen Vibrationsniveaus des Wassermoleküls (im Dampf) und ihre dazugehörigen Wellenlängen.

Die Absorptionsbanden sind im Spektrum des flüssigen Wassers (Clustersspektrum) zu geringeren Wellenzahlen hin verschoben ("Rotverschiebung"). Das Ausmaß der Rotverschiebung der Absorptionsbanden weist darauf hin, daß es sich um eine relativ starke Wasserstoffbrücke handelt. Aus den Verschiebungen der Absorptionsbanden im IR-Spektrum des flüssigen Wassers relativ zum Spektrum des isolierten Wassermoleküls lassen sich die Informationen über Bindungsverhältnisse und Struktur gewinnen.

2.3. Digitale Bildverarbeitung und Fernerkundung

"Ein Bild sagt mehr als 1000 Worte"

Dieses bekannte Sprichwort beschreibt viel von der Faszination, die von den digitalen Bildern ausgeht, die mittels der Bildverarbeitungsmethoden aufgenommen und ausgewertet werden. Wir Menschen können die Bilder in Echtzeit mit den Augen aufnehmen (sehen), genauso schnell verstehen und interpretieren. Auf gleichem Prinzip basieren die moderne digitale Bildverarbeitungsmethoden, die uns die in Bildern versteckt enthaltene Information gewinnen und analysieren lassen. Die Verfahren der digitalen Bildverarbeitung erschließen aufgrund der immer leistungsfähiger werdenden Rechner immer neue Einsatzgebiete. Moderne Wissenschaft und Technologie wäre ohne computergestützte Bildverarbeitung nicht denkbar [Jähne 1999].

Wesentliche Charakteristika von Bildverarbeitung und Fernerkundung sind die berührungslose Aufnahme, die simultane Erfassung verschiedener Strahlungseigenschaften wie Energie, Phase und Polarisation, die kurze Aufnahmedauer und damit die Möglichkeit zur Erfassung dynamischer Prozesse, die Auswertung in drei Dimensionen sowie die Möglichkeit, fast beliebig große Objekte zu bearbeiten. Die Zielsetzungen die bei der digitalen Verarbeitung von Bilddaten verfolgt werden, sind sehr verschieden. Sie reichen von einfacher Kontrastverbesserung bis zu komplexen Analysen der Bild- oder Spektralsignaturen. Diese Methoden werden für verschiedenste Zwecke von der Rasterelektronenmikroskopie bis hin zur Beobachtung ganzer Planeten eingesetzt.

2.3.1. Computergesteuerte Bildverarbeitung

Die Bildverarbeitung beschäftigt sich mit der Erzeugung, der Bearbeitung, der Analyse und der Auswertung von digitalen Bildern bei vorgegebenen Fragestellungen. Über die Techniken der digitalen Bildverarbeitung lassen sich spezifische Bildinhalte aus dem Datensatz mittels Computer extrahieren. Digitale Aufnahmen haben eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zu Photographien bzw. anderen Distanzmessungen. Die wichtigsten sind :

- quantitativen Erfassung und Auswertung der Lichtenergie,
- geometrisch / radiometrische Bildauswertung,
- Erweiterung des registrierten elektromagnetischen Spektrums,
- höhere spektrale Auflösung,
- simultane Erfassung verschiedener Strahlungseigenschaften: Energie, Frequenz,
- Möglichkeit, die Kopien ohne Verlust an Bildqualität herzustellen,
- Bildsequenzen ermöglichen dynamische Prozesse und bewegliche Objekte auswerten,
- Potential zur Echtzeitverarbeitung durch Automation der Auswertung.

Aufbau eines digitalen Bildverarbeitungssystems

Die typischen Arbeitsschritte mit einem Bildverarbeitungssystem sind:

- Bildaufnahme (CCD-Kamera, Scanner, Frame-Grabber),
- Bilddigitalisierung und Speicherung (Digitizer),
- Bildverarbeitung und Bildanalyse (Computer mit Programm),
- Bildwiedergabe (Bildschirm, Drucker).

Über ein Aufnahmegerät wird das Ausgangsbild in digitale Form überführt. Diese Daten werden in der Regel in einer Matrix gespeichert. Jedes Matrixelement repräsentiert den Grau- oder Farbwert eines bestimmten Bildpunktes (Pixel). Eine Verarbeitung dieser

digitalen Signale erfolgt danach in Rechnern. Auf dem Ausgabegerät wird dann das Resultat präsentiert.

Bildaufnahme

Eine Bilderzeugung ist die Überführung der räumlichen Intensitätsverteilung in das digitale Bild. Dazu erforderlich ist ein bildgebendes System, ein PC mit Framegrabberkarte und eine Bilderfassungs- und eine Bildwiedergabesoftware. In den häufigsten Fällen besteht das bildgebende System aus einer geeigneten Beleuchtungseinrichtung, einem optischen Abbildungssystem und einer CCD-Kamera als optoelektronischer Wandler. Die Bildinformation wird in einer optoelektronischen Einrichtung als Zeile oder Fläche ausgeführten Halbleiterchip unter Ausnutzung unterschiedlicher Prinzipien aufgenommen und gespeichert. Gebräuchlich sind vor allem CCD-Kameras auf der Basis ladungsgekoppelter Speicher (CCD=charge-coupled device), der aus Ketten von Kondensatoren besteht und durch Belichtung die Ladungen freisetzen kann. Dieser Entladungsimpuls wird zeilenweise abgespeichert. Moderne CCD-Kameras verfügen über eine flächenhafte CCD-Anordnung (Zeilen x Spalten). Je nach Größe des Objektes muß eine entsprechende Optik gewählt werden; dabei wird der gesamte Bereich von mikroskopischen Dimensionen bis zu makroskopischen Objekten überstrichen.

Digitalisierung und Speicherung von Bildern

Bilder liegen entweder primär analog (Photo) oder digital (Datenträger) vor. Photographische Bilder speichern die Information analog in Form von kontinuierlichen Grau- oder Farbwerten auf der photographischen Schicht. Digitale Bilder bestehen aus matrixnumerisch kodierten Zahlenwerten, die jederzeit erneut über Programme kopiert und bearbeitet werden können. Eine Bildmatrix besteht immer aus Bildspalten (columns) und Bildzeilen (rows).

Mathematisch läßt sich ein Bild als eine Funktion $f(x, y)$ mit

$$f_{\min} < f_i < f_{\max}; \quad x_{\min} < x_i < x_{\max}; \quad y_{\min} < y_i < y_{\max}$$

beschreiben. Dabei gibt $f(x, y)$ die Intensität (Grauwert) an jedem Bildpunkt mit den Koordinaten (x, y) an. Zur Verarbeitung des Bildes $f(x, y)$ auf einem Digitalrechner muß dieses in eine geeignete numerische Darstellung überführt werden. Dieser Vorgang heißt Digitalisierung. Man unterscheidet zwischen der Digitalisierung des Definitions- und Wertebereiches (Rasterung und Quantisierung). Damit wird das kontinuierliche Bild in eine endliche Anzahl von Bildpunkten oder Pixel (x, y) zerlegt. Der Grauwertebereich $f(x, y)$ wird in eine endliche Anzahl von Stufen $f_{\min} < f_i < f_{\max}$ eingeteilt.

Charakterisierung digitaler Bilddaten

Pixel

Jedes Bild besteht aus einer Matrix von gleichartigen Bildelementen, so genannten *Pixeln*, die Flächeneinheit eines digitalen Bildes, die durch eine bestimmte Position in der Bildmatrix und durch einen Grauwert gekennzeichnet ist. Die Zahl der Pixel entscheidet über die räumliche Auflösung des Digitalbildes.

Grauwerte

Bei Schwarzweißbildern wird jedem Pixel ein *Grauwert* zugeordnet. Die Zahl der Grauwerte definiert den dynamischen Intensitätbereich. Digitale Grauwertzerlegung von Schwarz (0) nach Weiß (höchste Wert) führt zu einer Grauwertspanne von 256 Grauwertstufen (von 0 bis 255) bei einem Byte ($8\text{bit} = 2^8 = 256$). Erweitert man diese Quantisierung je Pixel auf eine höhere Auflösung, so erhält man z.B. für 12 bit ein Bild mit $2^{12} = 4096$ Graustufen (von 0 bis 4095).

Densitogramm (Grauwerte-Histogramm)

Zur Grauwert-Charakteristik von Bildern gehören statistische Kennwerte, die Aussagen über die Grauwerte-Verteilung und damit über das zu erwartende Bild ermöglichen. Üblicherweise wird in der digitalen Bildverarbeitung die Statistik der Bilder über ein Grauwert-Densitogramm (Häufigkeitsverteilung der Grauwerten) beschrieben (Abb.2.3.1). Also ein Grauwert-Densitogramm ist eine tabellarische oder graphische Darstellung, die zeigt, wie häufig einzelne Grauwerte in einem Bild vorkommen.

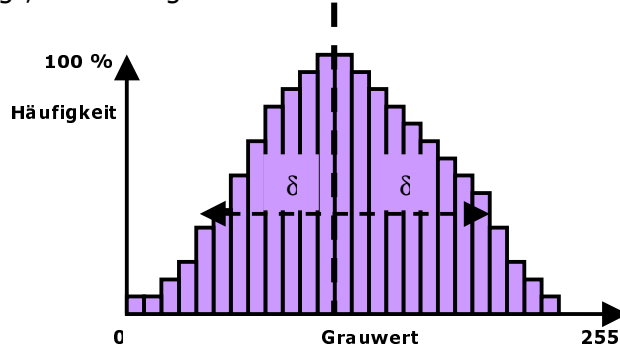


Abb.2.3.1: Densitogramm der Häufigkeitsverteilung der Grauwerten vom Digitalbild.

Die wichtigsten grundlegenden statistischen Parameter des Bildes sind: minimaler, maximaler und mittlerer Grauwert sowie Standardabweichung (δ) und Varianz (δ^2).

Der abgeleitete mittlere Grauwert sagt zunächst etwas über die mittlere Gesamthelligkeit des Bildes aus. Liegt er nahe dem Wert Null (0 = schwarz) ist das Bild extrem dunkel; liegt er nahe dem Maximalwert (weiß) ist das Bild extrem hell. Standardabweichung und Varianz sagen etwas über den Kontrastumfang des Bildes aus. Ist die Standardabweichung groß, liegt ein kontrastreiches Bild vor. Ähnliches gilt für die Varianz. Viel Kontrast bedeutet also, daß viele unterschiedliche Graustufen am Bildaufbau beteiligt sind und das Bild somit auch viel Information enthält.

Dimension von Digitalbildern

Digitale Bilder können Information von verschiedener Dimensionstufe n aufweisen:
 Grauwertbild : $n = 2$; Farbbild : $n = 3$; Multi-spektral-Bild : $n > 3$.

Auflösungsvermögen

Digitaldaten des Bildes besitzen verschiedene Auflösungsvermögen zur Erfassung von unterschiedlichen Objektcharakteristiken:

- **räumliche Auflösung** : kleinste lineare oder winkelmäßige Trennung zweier Objekte durch einen Sensor;
- **radiometrische Auflösung**: Anzahl der vom Aufnahmesystem unterschiedenen Grauwertstufen in die das empfangene Signal unterteilt wird (z.B. 8 bit=256 Stufen);
- **spektrale Auflösung**: Vermögen des Aufnahmesystems, einzelne Wellenlängenbereiche zu trennen;

Bildverarbeitung und -analyse

Bildverarbeitung nennt man die Gesamtheit der Verfahren, durch die ein digitales Bild rechnerisch in ein verändertes digitales Bild überführt wird. Nach der Digitalisierung des Bildes kann unter Nutzung entsprechender Hard- und Software die gewünschte Bildverarbeitung durchgeführt werden. Dafür existiert eine Vielzahl von Bildverarbeitungsoperationen, die einen wahlfreien Zugriff zu den Bildpunkten haben, die diese sowohl lesen als auch verändern können. Bildverarbeitungsschritte können als mathematische Transformationen der Ursprungsmatrix in eine neue Bildmatrix

verstanden werden, d.h. durch die Transformationsfunktion wird die zweidimensionale Eingabematrix $f(x,y)$ in eine neue zweidimensionale Ausgabematrix $f'(x',y')$ umgewandelt, wobei alle Grauwerte zwischen 0 und 255 (0 und 4095) liegen müssen.

Insgesamt finden drei Gruppen von Funktionen Anwendung:

- **geometrische Transformationen:** Bilder werden in ihrer Form verändert, die ursprünglichen Grauwerte bleiben dabei erhalten (Translation, Rotation, Scherung),
- **radiometrische Transformationen:** Grauwerte werden verändert, während die geometrischen Eigenschaften erhalten bleiben (Kontrastverbesserung, unterdrücken von Rauschen),
- **Integral-Transformationen im Frequenzbereich :** Das Bild wird dabei als Überlagerung von Schwingungen unterschiedlicher Frequenzen interpretiert, welche gefiltert werden können und so bestimmte Bildstrukturen gerichtet herausfiltern können (Filterungen).

Geometrisch / radiometrische Bildauswertung

In der Vergangenheit waren die einzelnen Schritte der geometrisch / radiometrischen Bildauswertung relativ klar voneinander abgegrenzt. Heute verschwimmen die Grenzen, weil eine strenge Trennung zwischen beiden Gebieten sowohl bei der manuellen als auch bei der automatischen Bildauswertung nicht möglich ist, da sie sich gegenseitig beeinflussen und benötigen. Es ist inzwischen klar, daß sowohl geometrische als auch radiometrisch-spektrale Informationen über die einzelnen Objekte vorhanden sein müssen, um erfolgreich Bildanalyse betreiben zu können. Radiometrische und spektrale Eigenschaften dominieren in geringeren Auflösungen, was den guten Erfolg der Multispektralklassifikation für Satellitenbilder größerer Bodenauflösung ebenso erklärt wie die mäßigen Ergebnisse derselben Technik für hochauflösende Satelliten- und Luftbilder [Lohmann 2002].

Bildverarbeitungsoperationen

Arithmetische Pixeloperationen

Da das Bild in Form von diskreten digitalen Bildpunkten gespeichert ist, kann es durch arithmetische Pixeloperationen leicht manipuliert werden. Unter Punktoperationen versteht man Funktionen, bei denen die Grauwerte von Bildern oder Bildbereichen Pixel für Pixel nach verschiedenen Zielkriterien modifiziert werden. Addition, Subtraktion, Division und Multiplikation gehören zu den grundlegenden arithmetischen Pixeloperationen.

Filteroperationen und Fourier-Transformation

Während die Punktoperationen keine Informationen benachbarter Bildpunkte verwenden, gibt es auch viele Operationen, die, ausgehend von einem bestimmten Bildpunkt, eine Umgebung dieses Bildpunktes berücksichtigen. Unterschiedliche Filteroperationen gehören zur Gruppe der komplexen Pixeloperationen. Übliche Filtergrößen liegen bei 3x3 bzw. 5x5 Pixel. Viele dieser Operationen können als digitale Filter im Ortsbereich bzw. Frequenzbereich interpretiert werden. Man unterscheidet ein- und zweidimensionale lineare Filter und nichtlineare Filter. Theoretische Grundlage dieser Filteroperationen ist die diskrete *Fourier-Transformation*. Mit den genannten Filteroperationen läßt sich u.a. folgendes realisieren: *Glättung* der Bilder durch Mittelwertbildung; *Rauschunterdrückung* durch Tiefpaß-Filter; *Kantenhervorhebung* durch Gradientenfilter (Hochpaß-Filter); *Extraktion* von Kanten und Linien; *Fourier-Transformation* (Nutzung als digitaler Filter im Bereich der Ortsfrequenzen) und s. w. [Jähne 1997].

Sonstige Operationen

Neben den vorgestellten Verfahren gibt es noch viele weitere Operationen z.B. zur Bildverbesserung. Eine einfache Methode der Bildverbesserung in Form einer *Kontrastmanipulation* besteht in der Modifikation der Grauwertverteilung durch verschiedene Transformationen (*Grauwerttransformationen; Skalierung; Logarithmusfunktion; Histogrammskalierung*). Man unterscheidet noch weitere Vielzahl der Verfahren zur Bildverbesserung, wie Bildverknüpfungen und Bildumwandlungen. Zu den Bildverknüpfungen gehören z.B. das Aufaddieren von Bildern zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses oder die Differenzbildanalyse zur Hervorhebung von Abweichungen vom Sollzustand. Neben diesen Bildverbesserungsoperationen bieten viele Bildverarbeitungssysteme eine Vielzahl weiterer Funktionen an. Hierzu gehören u.a. die Bildvermessung (Strecken, Winkel), die Flächenanalyse, der Bildvergleich und Methoden der statistischen Auswertung. Das Bildverarbeitungssystem wird so zum digitalen Bildanalysensystem.

2.3.2. Multispektrale Bildverarbeitung

Die Ableitung von Eigenschaften der abgebildeten Objekte stellt das eigentliche Ziel von Bildverarbeitung und Fernerkundung dar. Die Objekte werden sowohl geometrisch (Position, Lage, Größe, Form) als auch bezüglich ihres radiometrischen und spektralen Aussehens (Helligkeit, Textur, spektrale Signatur) und ihres zeitlichen Verhaltens beschrieben. Zwischen Bildverarbeitung und Fernerkundung besteht schon lange eine Beziehung. Das gemeinsame Prinzip besteht in der flächenhaften Messung verschiedener Eigenschaften elektromagnetischer Wellen eines bestimmten Wellenlängenintervalls, die von Objekten ausgestrahlt oder reflektiert werden. Dabei kommen als Meßgrößen Energie, Phase, Polarisierung und Laufzeit der elektromagnetischen Wellen in Betracht.

Spektrale Bildverarbeitung (bildgebende Spektrometrie)

Früher standen die geometrischen Aspekte im Vordergrund der Bildauswertung. Die Beschäftigung mit digitalen Bildern innerhalb der Bildverarbeitung und Fernerkundung hat aber dazu geführt, daß sich der Schwerpunkt von geometrischen Fragen hin zur radiometrischen und spektralen Bildanalyse verlagert hat [Albertz 1999, Cocks 1998].

Bei der spektralen Bildverarbeitung werden gleichzeitig räumliche und spektrale Informationen aufgenommen und ausgewertet. Mathematisch läßt sich ein Spektralbild als eine Funktion $f(x, y, \lambda)$ beschreiben, wobei λ eine Spektralkoordinate (Wellenlänge) ist. Durch berührungslose Messungen und orts aufgelöste Analyse mehrerer tausend (bzw. millionen) Spektren pro Objekt sind hochpräzise Aussagen über optischen Eigenschaften der abgetasteten Objekte möglich.

Hauptsächlich wurde spektrale Bildverarbeitung bei der Fernerkundung eingesetzt. Dabei ist die Sensibilität eines Bildverarbeitungssystems durch die spektrale Empfindlichkeit der Sensoren definiert. Man unterscheidet in der Fernerkundung panchromatische, chromatische und infrarotempfindliche Schichten. Aufgesetzte Objektivfilter erlauben bei der Aufnahmen das gezielte Ausblenden von einzelnen Spektralbereichen. Unterhalb von 400 nm wird die Energie der Strahlung durch das Objektivglas absorbiert. Jeder Sensor eines Fernerkundungssystems nimmt genau definierte Bereiche des elektromagnetischen Spektrums auf und speichert diese digital ab. Die entsprechenden Spektralbereiche werden als Kanäle bezeichnet.

Panchromatische Aufnahme

Panchromatische Schichten sind bis etwa 700 nm empfindlich, also für den gesamten Bereich des VIS. Infrarotempfindliche Schichten gehen mit ihrer Empfindlichkeit über

700 nm hinaus. Deshalb blendet man häufig kurzwelligere Strahlung durch geeignete Filter aus um so nur den NIR-Informationsgehalt abzulichten.

Multispektral- und Hyperspektralaufnahmen

Spektralaufnahmen, also simultane Aufnahmen in mehreren Spektralkanälen, sind in der Satellitenfernerkundung schon seit Jahrzehnten Standard. Hintergrund ist die Tatsache, daß sich Objekteigenschaften eher spektral und weniger durch geometrische Größen beschreiben lassen [Smith 2001]. Moderne sogar einfache Fernerkundungssysteme besitzen neben einem panchromatischen Kanal vier Spektralkanäle (Rot, Grün, Blau und Infrarot). Der Infrarotkanal bietet insbesondere für Vegetationsuntersuchungen wichtige, zusätzliche Informationen.

Wenn gleichzeitig mehrere Wellenlängenbereiche getrennt erfasst werden, spricht man von einem multispektralen Bildaufnahmesystem. Hyperspektrale Aufnahmesysteme sind durch eine deutliche Erhöhung der Anzahl der Spektralkanäle gekennzeichnet. Beispiele sind *DAIS* (Digital Airborne Imaging Spectrometer) vom Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt mit 79 und *HyMap* von Integrated Spectronics mit mehreren hundert Spektralkanälen zwischen dem VIS und IR Bereich [Cocks 1998]. Solche Hyperspektral-Bilddaten werden in sogenannten Bildwürfeln verwaltet und analysiert. Durch Einsatz hyperspektraler Sensoren in der abbildende Spektrometrie werden bessere Informationen der spektralen Eigenschaften von Vegetation gewonnen als es mit multispektralen Sensoren möglich ist, weil spektrale Auflösung der Hyperspektral-Bilddaten wesentlich höher (von einigen Nanometern) ist. Anwendungen bestehen vor allem in der geologischen Erforschung und der Umweltbeobachtung [Schläpfer 1998].

Die multispektrale Erfassung von Strahlung ist deshalb sinnvoll, weil verschiedene Objekte (z.B. Wasser, Vegetation) in unterschiedlichen Wellenlängenbanden auch unterschiedlich stark absorbieren/reflektieren - sie sind somit multispektral differenzierbar. Andererseits können in Spektralbildern möglicherweise Unterschiede in der Verteilung von Objektbestandteilen zu erkennen sein, die in monochromen oder Farbbildern verborgen bleiben.

Spektraloperationen

Unter dem Begriff der Spektraloperationen sollen alljene Bildoperationen zusammengefaßt werden, welche zur gezielten Herausarbeitung und Optimierung der Darstellung der spektralen Bildinhalte dienen. Mathematischer Hintergrund derartiger Spektraloperationen ist die Tatsache, daß multispektrale Sensoren die variierenden Spektralcharakteristika von Oberflächenmaterialien in verschiedenen Kanälen aufnehmen und so Datensätze mit unterschiedlichem statistischem Charakter als Maß der unterschiedlichen Lichtintensität vorliegen. Man vergleicht durch die arithmetische Funktion die Datensätze miteinander, in der Hoffnung, daß sich bestimmte Zielobjekte in ihrer Spektralcharakteristik deutlich in den Kanälen voneinander abheben und so im resultierende Datensatz besser kenntlich sind.

Die Ratiosbildung ist ein bekanntes Werkzeug der digitalen Aufbereitung multispektraler Datensätze, da hier sehr gezielt Spektraleigenschaften bestimmter Materialien (z.B. Vegetation) im neu errechneten Bild hervorgehoben werden können. Ein klassisches Beispiel ist die Vegetationsindizierung, welche im nahen IR die maximalen Reflexionswerte aufweist [Borgefors 1999].

2.3.3. Bildgebende Spektrometrie für Vegetationserfassung

Bei der Flugzeug- und Satellitenfernerkundung werden Bild- oder Spektralsignaturen der vom Boden reflektierten Strahlung gemessen. Neben den anderen Komponenten (Boden, Gesteine, Wasser) unterscheidet man in diesen Spektralsignaturen auch die Reflexionsspektren und -bilder von Vegetation. Das Reflexionsverhalten von Vegetation ist vom physiologischen und phänologischen Zustand der untersuchten Pflanzen abhängig, wobei im VIS Wellenlängenbereich der Pigmentengehalt, im NIR 0,78 - 1,3 μm Bereich die Zellstruktur (Biomasse) und bei 1,3 - 3 μm der Wassergehalt der Zellen die Reflexion beeinflussen (Abb.2.3.2) [Jürschik 1988].

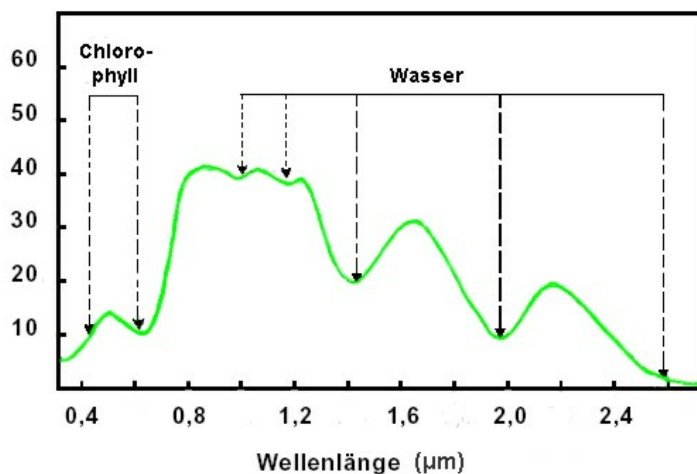


Abb.2.3.2: Reflexionsspektrum von Vegetation.

Tabelle 2.3.1 gibt ein Übersicht über den Einfluß verschiedener Merkmale von Pflanzen auf ihre Spektralcharakteristik [Gebhardt 1987].

Faktor	Pflanzen Merkmale	Spektralbereich
Blattoberfläche	Kutikula (Wachs) Rauhigkeit Haare	Remission im UV und blau Bereich
Blattpigmente	Zusammensetzung, Konzentration, Verteilung, Chlorophyll: Carotine:	Absorption im UV und VIS Bereich 400 - 450 und 630-680 nm 450 - 500 nm
Struktur	Mesophyllgewebe Zellwanddiche	Remission im NIR Bereich 700-900 nm
Wassergehalt	Pflanzenwasser	Absorption in NIR und MIR 1300 - 2500 nm

Tabelle 2.3.1: Einfluß verschiedener Merkmale von Pflanzen auf ihre Spektralcharakteristik.

Quantitative Pflanzenparameter wie Chlorophyll- und Wassergehalt, Biomasse, Blattflächenindex und andere können durch die spektrale Remissionscharakteristika im VIS/NIR ermittelt werden. Für die Bestimmung dieser Parameter sind eine Vielzahl spektrale Indizes entwickelt worden [Gebhardt 1987]. In digitalen Modellen werden diese Indize verwendet, um die Rückschlüsse auf den Vegetationszustand zulassen.

Besonders wichtig ist die Unterscheidung zwischen dem VIS und IR Spektrum, da grüne Pflanzen markante Unterschiede innerhalb dieser Bänder aufweisen.

Als Faustregel kann gelten: je vitaler die Vegetation, um so höher sind der Pigment- und Wassergehalt und dementsprechend stärker die Absorption im Sichtbaren und im Infrarot bei 1,3-3 μm und höher Reflexion im NIR bei 0,78-1,3 μm . Der Zustand der Pflanzenfelder oder Pflanzenerdfächen wird über dessen Vitalität abgeschätzt. Reflexionsgrad bei grünen Pflanzen mit Erreichen des NIR Bereiches (>700 nm) stark anwächst und auf die spezifischen Reflexionsmerkmale des zellulären Blattgefüges und der internen Wasser-versorgung zurückzuführen ist. Beide sind bei geschädigter oder absterbender Vegetation oft gestört und wirken sich so auf den Reflexionsgrad der Pflanze aus. Besonders wichtig sind die Blattpigmente *Chlorophyll a* und *b* mit unterschiedlichen Reflexionsgraden im Bereich zwischen 400 und 700 nm. Das Maß der Reflexion im IR kann also als Vitalitätsfaktor gesehen werden; IR-Aufnahmen sind somit für die Fernerkundung unter biologisch / ökologischen Aspekten besonders geeignet.

Die Vegetationsindexe sind von den optischen Eigenschaften der Pflanzenblätter (Blattspektren, Blattwinkelverteilung) abhängig und somit Aussagen über den Zustand der Vegetation erlauben:

- Der *SDVI* (Standardisierter Differenz-Vegetationsindex) ist spektrale VIS / NIR-Ratio und bildet ein Maß für die photosynthetische Aktivität und ist stark mit Dichte und Vitalität der Vegetationsdecke korreliert.
- *CAI* (Chlorophyll-Absorption-Integral) ist ein hyperspektraler Index zur quantitativen Bestimmung von Pflanzenparametern. Der CAI korreliert mit dem Chlorophyllgehalt von Pflanzenbeständen, ist sensitiver als übliche Indizes und den kann nur mit Abbildenden Spektrometern bestimmt werden.
- "*Red-Edge*"-Index ist ein Maß für die Vitalität grüner Pflanzen und wird durch den maximalen Punkt des Anstiegs der Reflexion von Vegetation im Nahen Infrarot (700-750 nm) bestimmt.

Tabelle 2.3.2. gibt einen Überblick über gebräuchliche Vegetationsindizes [Giovachini 1986].

Vegetationsindizes	Abkürzung	Berechnung
Ratio	R	NIR / R
Square Ratio	SQR	$(\text{NIR} / \text{R})^{0,5}$
Log Ratio	Log R	$\text{Log} (\text{NIR} / \text{R})$
Differences	D	$\text{NIR} - \text{R}$
Differences- Differences	DD	$(\text{NIR} - \text{RIR})^2 - (\text{R} - \text{G})^2$
Normalized Differences	ND	$(\text{NIR} - \text{R}) / (\text{NIR} + \text{R}) + 0,5$
Transformed Vegetation Index	TVI	$((\text{NIR} - \text{R}) / (\text{NIR} + \text{R}) + 0,5)^{0,5}$

Tabelle 2.3.2: Verbreitete Vegetationsindizes.
(G=Grün; R=Rot; NIR=nahes Infrarot; RIR=Rot+Infrarot)

Der Ertrag ist der wichtigste Zielparameter der landwirtschaftlichen Produktion. Im Rahmen von Ertragschätzungen können Fernerkundungsmethoden zur Ermittlung der Anbauflächen berechnen werden. Über die Einschätzung des Bestandszustandes in bestimmten Entwicklungsphasen und mit Hilfe von digitaler Computersimulation kann die Prognosegenauigkeit verbessert werden. Multispektale Bildverarbeitung-Daten sind dabei unersetzlich. Dies ist z.B. für das Erkennen kranker Pflanzen wichtig.

Fazit

Bildverarbeitung und Fernerkundung in enger Verzahnung mit den Nachbardisziplinen leisten einen wesentlichen Beitrag sowohl zu wissenschaftlichen Fragestellungen als auch zu praktischen Aufgaben. Im technischen Bereich sind die Entwicklungen der letzten Jahre im Bereich der Bildaufnahme sicher am spektakulärsten, aus wissenschaftlicher Sicht gilt dies für die Fortschritte bei der Automation der Bildanalyse, die teilweise auf den neuen Bildaufnahmesystemen und teilweise auf neuen Erkenntnissen beruhen. Die Integration der einzelnen traditionellen Disziplinen zur Erfassung, Analyse und Interpretation von Bilddaten stellt eine der größten Herausforderungen dar, vor denen Bildverarbeitung und Fernerkundung heute stehen.

Neue Hyperspektrale Bildaufnahmesysteme lassen die Trennung eines Bildes in Kontextgebiete durch Multispektralklassifikation mit hoch aufgelösten Bilddaten. Bei vegetationsbezogenen, fernerkundlichen Auswertungen ist man bestrebt die Ergebnisse der Signaturanalyse in die pflanzenbauliche Beurteilungsschemas einzuhängen. Aber es fehlt an exakte Modelle der Blattoptik und präzise optische Blattparameter, die im Labor mittels abbildende Spektroskopie erhalten und analysiert wurden. Kausalbetrachtungen sind bei der Interpretation von Vegetationspektren schwieriger als es auf dem Abb.2.3.2 grob aufgezeichnet ist, weil das Reflexionsverhalten der Pflanzen durch ein komplexes System bestimmt wird:

- unterschiedliche Stoffe (Wasser, Photopigmente, Zellulose, Proteine, Lignin)
- unterschiedliche Anordnung der Stoffe (Zellinneres, Zellwände, Blattaufbau, Stamm.)

Es fehlt noch an exakten Erklärungen von Blattspektren besonders für den NIR Bereich, die Fernerkundung-Vegetationsdaten präziser deuten lassen könnten. In Rahmen dieser Arbeit wurde dieses über Beurteilung der Lichtstreu-, Polarisations- und Spektral-Blattcharakteristika, als auch über räumliche Verteilung und Gehalt von Pigmenten und Wasser in Pflanzenblättern durchgeführt. Dafür wurden neue Verfahren der orts aufgelöste und bildgebende Spektroskopie als auch neue Bildverarbeitungstechniken entwickelt. Dabei wurden nicht nur Reflexion sondern auch Transmissionsspektren untersucht, weil diese "tiefere" Deutung der optischen Eigenschaften des Blattes und eine exakte Auswertung mittels der physikalischen Gesetze ermöglichen.

Kapitel 3

Botanische Grundlage

3.1. Pflanzenblattaufbau

Ziel dieser Arbeit war es die Untersuchung der Blattoptik und die Erfassung der räumlichen Verteilung der Blattsubstanzen und -strukturen mittels der optischen Bildverarbeitungsmethoden. Im Hinblick auf optische Eigenschaften des Blattes werden in diesem Kapitel die Blattanatomie und physiologischen Funktionen von Blattgeweben beschrieben.

3.1.1. Makroskopischer Blattaufbau

Der Ausgang der Pflanzenorganismen auf den Festland führte zu ihrer Baukomplikation und zur Entstehung des Blattes - des spezialisierten Organs für die Absorption der Sonnenenergie und für die weitere Umwandlung dieser Energie in der Form chemischer Molekularverbindungen bei Photosynthese. Im Laufe der Evolution sind die Blätter verschiedener Größen, der Morphologie und anatomischen Aufbaus entstanden (Nadel, Sukkulente, die Blätter monokotyle und dikotyle Pflanzen), die verschiedene biochemische und physiologische Besonderheiten haben. Aber zugleich in ihrem Aufbau sowie in den Prinzipien und Mechanismen der primären photosynthetischen Prozesse werden die Gemeinsamkeit beobachtet [Smith 1997].

Die grünen Blätter sind die Organe sowohl für die Photosynthese als auch für die Transpiration. Sie sind nach dem Prinzip der Oberflächenvergrößerung flach gestaltet, um die Abgabe von Wasserdampf und den Gasaustausch für die Atmung und Photosynthese zu fördern und einem Lichteinfall eine möglichst große Fläche zu bieten. Diesen Funktionen entspricht auch ihre Gliederung in Blattspreite (Blattfläche) und Blattstiel, sowie ihr anatomischer Bau. Typischerweise ist das Blatt einige hundert Mikrometer dick, z.B. beträgt die Blattdicke von Rizinus 200 - 300 µm.

Der Wasser-, Nährstoffen- und Assimilatentransport geschieht in der Pflanze über zwei Leitgewebe: *Xylem* und *Phloem*. Im Sproß sind beide Systeme zu sogenannten Leitbündeln zusammengefaßt, die in Blättern in der Form der Adern gut erkennbar sind.

Blattadern

Die Blattadern geben dem Blatt eine benötigte Stabilität, so daß es vor einem Bruch geschützt ist und sich optimal zur Sonne orientieren kann. Die Basisfunktion der Blattadern ist die Versorgung der photosynthetisch aktiven Mesophyttzellen mit Wasser und Nährsalzen sowie der rasche Abtransport von Photosyntheseprodukten. In den Leitelementen bewegen sich konvektive Massenströme, außerhalb der Adern ist der Stofftransport auf Diffusion beschränkt. Ihre Effizienz im Stofftransport nimmt mit dem Quadrat der zu überwindenden Strecken ab und wird schon im Dimensionbereich weniger Zelldurchmesser ungenügend. Selbst Wasser strömt durch Gefäße etwa 1 Million mal leichter als durch lebendes Gewebe. Dementsprechend bilden die Adern in der Blattspreite so dichte Muster aus, daß in den zwischen ihnen liegenden Interkostalfeldern keine Zelle um mehr als 7 weiteren Zelle vom Leitbündel entfernt ist. Die Gesamtlänge der Leitbündel z.B. eines mittelgroßen Tabakblattes beträgt ca. 30 m.

Blattadernanatomie

Wie es bereits erwähnt wurde, bestehen Blattadern aus den Xylem- und Phloemgeweben. Das Xylem befindet sich stets auf der Oberseite innerhalb der Adern und das Phloem auf der Unterseite (Abb.3.1.2). In radialen Blattadern könnten sich Xylemzellen auch radial verteilen und Phloemzellen in der Mitte von Adern liegen.

Xylem

Die Hauptfunktion vom Xylem ist der Transport von Wasser und Nährsalzen von Wurzeln zu den Organen der Photosynthese. Das Xylem besteht aus Röhren (Tracheen und Tracheiden), die von hintereinanderliegenden toten und verholzten Zellen gebildet werden.

Phloem

Das Phloem sorgt für den Ferntransport organischer Photosyntheseprodukten (Assimilate) von den Blättern zu jedem des Verbrauches oder der Speicherung. Im Gegensatz zum Xylem besteht das Phloem aus im funktionsfähigen Zustand lebenden Zellen (Sieb- und Geleitzellen).

Blattadernnervatur

Schon bei Betrachtung mit bloßem Auge fällt an vielen Blättern ihre sogenannte Nervatur auf, das Adern-Muster in den Blattspreiten. Das typische Blatt ist bilateralsymmetrisch: es besitzt eine Mediane in der Blattstielrichtung, in der die Hauptader verläuft. Nach der Verteilung der Nervatur unterscheidet man parallel- oder bogennervige, netznervige und gabelnervige Blätter.

Parallelnervatur überwiegt bei nomokotylen Pflanzen. Dabei verlaufen alle Hauptadern längst, sind aber durch feine Querbündel miteinander verbunden. Besonders ausgeprägt ist diese Adernanordnung in den linearischen Blättern der Gräser und Getreide.

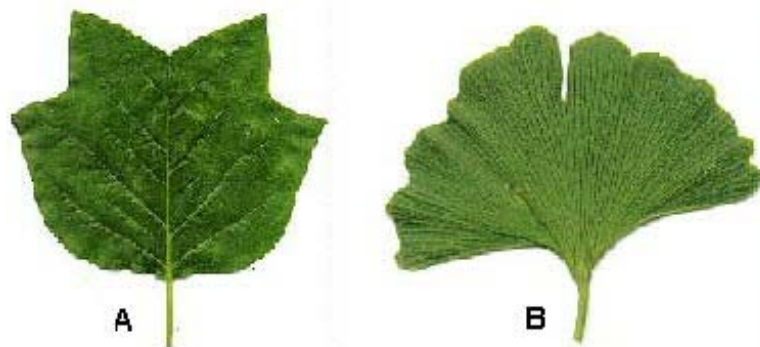


Abb.3.1.1. Blattadernnervatur dikotyler Pflanzen: Netznervatur bei Tulpenbaum: (*Liriodendron tulipifera*) (a) und Gabelnervatur bei Gingo (*Ginkgo biloba*) (b).

Netznervatur

Bei dikotylen Pflanzen sind kompliziertere Adernetze ausgebildet. Die Leitbündel bilden ein reich verzweigtes und hierarchisches Netz (Abb.3.1.1a). In der Regel zweigen von der Hauptader in bestimmten Winkeln die Nebenadern erster Ordnung ab, die wiederum Ausgangspunkte von Nebenadern zweiter Ordnung sind. Die feinen Adern werden immer kleiner und enden blind im Mesophyll.

Gabelnervatur

Phylogenetisch sehr alt ist die dichotome Gabelnervatur, die keine Mittelader aufweist. Sie findet sich nur noch bei wenigen rezenten Formen, wie z.B. bei Gingo (Abb.3.1.1b).

In dieser Arbeit wurden Adern verschiedener Ordnung dikotyler Pflanzenblätter Rizinus und Tabak mittels der Polarisations- und Spektralmethoden optisch extrahiert. Blattadern können als physiologische Koordinate für die Blattwachstumsmessungen dienen [Kirchgeßner 2003]. Das Wachstum ist ein Indikator für physiologische Prozesse in der Pflanze und wird dadurch zu einer wichtigen Beobachtungsgröße.

3.1.2. Mikroskopischer Blattaufbau

Die optischen Charakteristiken der Blätter sind durch eine spezifische, dynamische und fein organisierte Struktur bedingt. Ein "typisches" Blatt von C_3 -Pflanzen, die C_3 -Kohlenhydrate assimilieren, ist meist flächig ausgebildet und in seiner Anatomie dorsiventral, d.h. die Ober- und Unterseite sind verschieden aufgebaut. Das Blatt setzt sich aus mehreren Zellschichten zusammen, die ganz unterschiedliche Funktionen erfüllen (Abb.3.1.2). Das Blattgrundgewebe *Mesophyll* ist beiderseits von *Epidermis* bedeckt. Im Mesophyll zeichnen sich deutlich zwei verschiedene Gewebearten ab: *Palisaden-* und *Schwammparenchym*. Der Aufbau der Blattspreite aus verschiedenen Geweben läßt sich am besten anhand eines Blattquerschnittes darstellen:

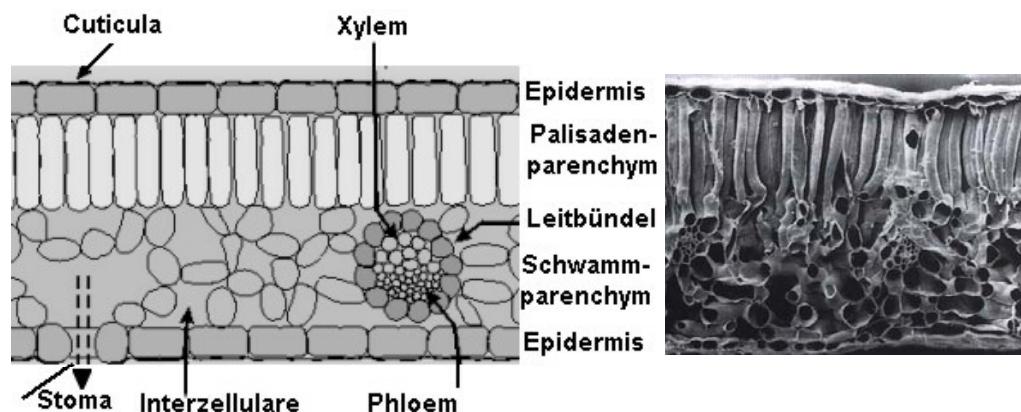


Abb.3.1.2: Anatomieschema und REM-Aufnahme (100:1) eines Schnittes durch ein Laubblatt (Nieswurz *Helleborus foetidus*) [Nultsch 1991].

Epidermis ist ein äußeres Abschlußgewebe der Blätter. Die obere Epidermis, besteht aus lückenlos aneinander anschließenden, chlorophyllfreien Zellen, deren Außenwand verdickt ist. Ihre Zellen dienen der Erhöhung der Reißfestigkeit des Blattes und der Undurchlässigkeit für Gase und Wasser. Die Blattunterseite wird von der unteren Epidermis abgegrenzt, die sich gewöhnlich durch den Besitz von Spaltöffnungen von der oberen Epidermis unterscheidet.

Cuticula überzieht die Epidermis vieler höherer Pflanzen und ist mit den Außenwänden der Epidermiszellen als Auflagerung fest verbunden. Cuticula besteht aus Wachsen (Ester von Fettalkoholen und Fettsäuren) und Cutin (Polyester aus Hydroxyfettsäure). Aufgrund seiner wasserabstoßenden Eigenschaften dient die Cuticula den Pflanzen in erster Linie als Verdunstungsschutz. Sie gewährleistet aber auch eine mechanische Stabilisierung sowie eine intensive UV-Lichtabsorption und einen hohen Reflexionsgrad mancher Blätter.

Palisadenparenchym ist das Grundgewebe des Blattes, dessen chlorophyllreiche, senkrecht zur Blattfläche stehende Zellen zu einem Palisadengewebe entwickelt sind. Diese dicht aneinander anschließenden Zellen (z.B. im Rizinusblatt 400 000 pro cm² Blattfläche) sind bei dem schwachen Lichteinfall angepaßten Schattenblättern in einer Schicht, bei dem starken Lichteinfall angepaßten Sonnenblättern in mehreren Schichten angeordnet. Die Palisadenparenchymzellen enthalten eine überwiegende Mehrzahl (etwa 80%) der Chloroplasten, stellen also das eigentliche Photosynthesegewebe dar.

Schwammparenchym ist die zweite unter den Palisadenzellen liegende Grundgewebeschicht, die aus locker angeordneten, chlorophyllarmen Zellen besteht und wegen ihrer Vielzahl an Hohlräumen (Interzellularen) den Namen Schwammgewebe trägt. Die Schwammparenchymzellen gewährleisten neben der Assimilation auch die Verbindungen für den Transport wässriger Lösungen zwischen den Palisadenzellen und den Blattadern.

Interzellularsystem

Die Hohlräume dienen der Durchlüftung und dem Transport der Gase (CO₂, O₂ und Wasserdampf). Das Interzellularsystem steht durch die Spaltöffnungen mit der Außenluft in Verbindung und vermittelt den Gasaustausch sowie die Wasserdampfabgabe. Interzellularen verursachen Bildung ausgedehnter innerer Oberflächen im Blatt, wobei das Verhältnis zwischen dem Interzellularräum und dem Gesamtvolumen art- und standortspezifisch ist. Durch die zahlreichen Interzellularräume, die bis 90% des Mesophyllvolumens ausmachen, ist die Gesamtoberfläche des Mesophyllgewebes oft mehr als 100 mal größer als die Blattfläche.

Stomata

Untere Epidermis besitzt zahlreiche Spaltöffnungen (*Stomata*). Selten können Spaltöffnungen auch auf der Blattoberfläche sein. Stomata regulieren den Gasaustausch und den Wasserhaushalt. Das Stoma besteht aus zwei Schließzellen mit einem Spalt dazwischen. Eine Drucksteigerung (Turgorerhöhung) in Schließzellen verstärkt ihre Krümmung, wodurch der Spalt geöffnet und erweitert wird; eine Turgorabnahme bewirkt ihre Abflachung und damit eine Verengung bzw. Schließung des Spaltes. Die Öffnungs- und Schließbewegungen erfolgen in erster Linie in Abhängigkeit von der Temperatur und Luftfeuchtigkeit und dienen dem Regeln der Verdunstung. Der dritte Regelungsfaktor ist das Licht, das für die jeweils mögliche Photosyntheseintensität und möglichst viel Kohlendioxyd sorgt.

Die hier skizzierte Struktur des Assimilationsgewebes wird im weiterem als ein Musterbeispiel für Selektion und Adaptation zitiert. Nach dem, was wir heute über die Photosynthese wissen, muß ein effizient arbeitendes Assimilationsgewebe zumindest folgende Kriterien erfüllen:

- Es muß so strukturiert sein, daß das einfallende Licht optimal genutzt werden kann
- Die Zellen bedürfen einer kontinuierlichen und ausreichenden Zufuhr von Kohlendioxyd.
- Alle Zellen müssen über einen direkten Zelle-zur-Zelle-Kontakt mit dem Leitungssystem verbunden sein, damit die Wasserzufuhr und Abtransport der Assimilate gewährleistet sind.

Die Konstruktion des Assimilationsgewebes der Laubblätter erfüllt die genannten Bedingungen auf eine nahezu ideale Weise. Die Versorgung der Pflanzen mit Licht, Kohlendioxyd und vor allem mit Wasser schwankt in weiten Grenzen. Daher ist es auch nicht verwunderlich, daß im Verlauf der Evolution Modifikationen des Konstruktionsplans mit erhöhtem adaptivem Wert entstanden sind, deren Ausprägung von Umwelt- und Standortbedingungen gesteuert wird.

C₃- Pflanzen

Bei manchen Pflanzen weicht die Gewebeanordnung im Blatt von der oben beschriebenen mehr oder weniger stark ab. Sie nennt man C₃-Pflanzen. Nicht selten befindet sich ein Palisadenparenchym auch innerhalb der unteren Epidermis.

C₄- Pflanzen

In den Blättern von C₄-Pflanzen (Gräsern und Getreide) ist das Mesophyll einheitlich, nicht in Palisaden- und Schwammparenchym gegliedert, und Spaltöffnungen sind ober- und unterseits gleich häufig. Damit sind C₄- Pflanzen an heißen Klima angepaßt und verhindern Photorespiration.

CAM-Pflanzen

Einige tropische Pflanzen wie *Crassulaceen* und sukkulente (wasserspeicherte) Arten der Dickblattgewächse (*Kalanchoe*) haben nur nachts die Stomata geöffnet, nehmen nachts CO₂ auf, speichern es und verwenden es am Tag. Um eine aktive Speicherung großer Wassermenge in Geweben zu gewährleisten, müssen sukkulente Pflanzen ihre Zellen und Gewebe vergrößern. Mit anderen Worten sie haben dicke, fleischige Sprossen und Blätter, in denen Anzahl und Größe der Parenchymzellen erhöht sind.

Fazit

Sogar eine kurze Betrachtung des Blattaufbaus zeigt eine komplizierte Organisation von Pflanzenblättern als ein optisches System. Dank dessen sind Pflanzen zu einer effektiven Lichtabsorption für Photosynthese fähig und können sich der Wirkung der Sonnenstrahlung in den vielfältigsten ökologischen Situationen anpassen.

Die optischen Charakteristiken der Blätter sind sowohl durch ihren spezifischen Aufbau als auch durch Veränderungen des Pigmenten- und Wassergehaltes bedingt. Auf dem Molekularniveau besteht das Pflanzenblatt aus Wasser und organischen Stoffen solche wie Cellulose, Stärke, Glykose, Fructose und Photopigmente (Chlorophylle, Carotinoide, Anhtozyane). Die spektralen Blätterncharakteristika klären sich vorzugsweise durch das Photopigmente- und Wassergehalt. Ihre Eigenschaften werden in den nächsten Kapiteln beschrieben.

3.2. Pflanzenblatt als optisches System

3.2.1. Grünes Blatt - eine Lichtmaschine

Keine physikalische Größe steuert und fördert die Entwicklung von Pflanzen in so starkem Maße wie das Licht. Die Mehrheit der Photoprozesse verläuft in den grünen Blättern. Das Blatt kann man als eine Maschine bezeichnet werden, die von der Lichtenergie funktioniert.

Das Licht ist die elektromagnetische Strahlung, die aufgrund ihrer Qualität (unterschiedliche Wellenlängen) und Intensität charakterisiert werden kann. Pflanzen messen beide Parameter und reagieren dementsprechend. Es gibt eine Vielzahl lichtinduzierter und lichtwellenabhängiger Reaktionen, und es gibt in den Pflanzen folglich auch eine Reihe unterschiedlicher Lichtrezeptoren (Photorezeptoren, Sensorpigmente). Meistens spielen lichtinduzierte Prozesse im Blatt ab.

Untersuchungen der optischen Eigenschaften von Blättern und ihrer Lichtabsorption haben eine große Bedeutung für das Verständnis der Grundprinzipien der Sonnenenergieassimilation und der Photosynthesemechanismen sowie der Wachstum- und Adaptierungsprozesse in den Pflanzen. Das Pflanzenwachstum wird durch drei lichtbedürftige Prozesse gesteuert: Photosynthese, Photomorphogenese, Photoperiodismus.

Photosynthese ist wichtigste dieser Prozesse (Kapitel 3.3), die die Grundvoraussetzung für das Pflanzenwachstum bildet. Bei der Photosynthese wird die Strahlungsenergie in die chemische Energie umgewandelt: diese ist für die Synthese der organischen Komponenten erforderlich, aus denen eine Pflanze sich zusammensetzt.

Photomorphogenese ist die lichtinduzierte Steuerung vom Pflanzenwachstum, wobei dem Licht (einer bestimmten Wellenlänge) eine Signalwirkung zukommt, durch die die Information in der Zelle entsteht, welche zur selektiven Aktivierung bestimmter Gene benutzt wird. Die Mehrzahl der photomorphogenen Prozesse von Landpflanzen wird durch einen Wechsel zwischen dem hellroten ($\lambda=660$ nm) und dunkelroten ($\lambda=730$ nm) Licht gesteuert. Der dazugehörige Rezeptor ist das *Phytochrom*, ein Protein-Chromophor-Komplex, der in zwei Zustandsformen vorliegen kann, die durch Belichtung reversibel von einem in den anderen überführt werden können.

Photoperiodismus ist eine Eigenschaft der Pflanzen, die Länge von Lichtperiode zu messen und dadurch viele physiologischen Prozesse zu steuern. Unter dem Begriff *Phototropismus* versteht man ein zur Lichtquelle hin gerichtetes Wachstum, das für vielzellige Pflanzen typisch ist. Die *Phototaxis* ist eine lichtinduzierte Ortsbewegung. Meist erfolgt sie in die Richtung einer Lichtquelle (positive Phototaxis); eine Bewegung in die entgegengesetzte Richtung ist die negative Phototaxis.

Die oben geschilderten Prozesse zeigen, wie stark die Pflanzen der geänderten Sonnenstrahlung angepaßt sind. Einige Arten sind fähig, die Photosynthese bei sehr hoher Lichtintensität in den Wüsten und andere Arten bei sehr niedriger Beleuchtungsstärke erfolgreich zu verwirklichen. Es wird auf verschiedene Weisen erreicht. Einige Pflanzen sind imstande, den Neigungswinkel der Blätter bei der hohen Beleuchtungsstärke zu ändern und damit die Lichtmenge, die Chlorenchym erreicht, zu verringern oder bestimmte Photoschutzstoffe anzusammeln. Je nach den Umgebungsbedingungen ändern sich die geometrischen Größen der Zellen und der Gehalt der Photosynthesepigmente oder auf verschiedene Weisen werden die photosynthetischen Gewebe und Membranen organisiert.

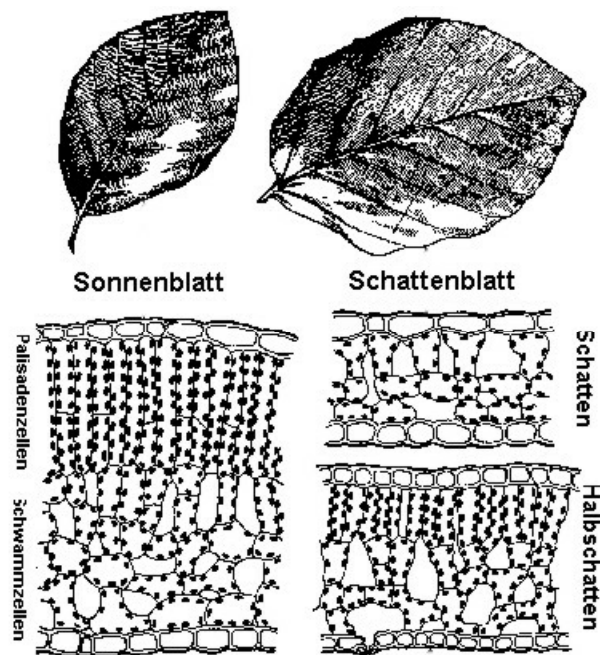


Abb.3.2.1: Sonnen-, Schatten- und Halbschattenblätter der Rotbuche.

Die Pflanze reagiert auf die unterschiedlichen Lichtwerte mit der Ausbildung spezialisierter Sonnen- und Schattenblätter (Abb.3.2.1). Schon an ein und demselben Baum finden sich Unterschiede um das zehnfache und mehr, je nachdem, ob man die Süd- oder die Nordseite eines Baums betrachtet oder die Außenregion der Krone mit der Unterkante vergleicht. Bei starker Beleuchtung sind die Blätter kleiner und derber und tragen eine mehrfache Lage von Zellschichten mit Chlorophyllkörnern zwischen der oberen und unteren Abschlußschicht. Die Schattenblätter sind größer und zarter, dabei aber dünner. Die chlorophyllreichen Zellen liegen in wenigen Schichten übereinander, im Grenzfall in nur 2 bis 3 Schichten, und können auch mehr Chlorophyllkörnchen enthalten. Es gibt dazu noch weitere physiologische und biochemische Anpassungen. Um die Photoprozesse und -anpassungen zu deuten untersucht man die optischen Eigenschaften von Blattgeweben.

3.2.2. Optik des Blattes

Das Blatt einer hochentwickelten Pflanze stellt ein kompliziertes optisches System dar, das über die Fähigkeit verfügt, wirksam und anscheinend optimal die Sonnenenergie auszunutzen [Gausman 1985, Larcher 1994, Merzlyak 1995]. Grundsätzlich kann ein Blatt die auftreffende Strahlung reflektieren, absorbieren und transmittieren. Was im einzelnen geschieht und wie sich Lichtreflexion, -absorption, -transmission und -streuung zueinander verhalten, hängt von den Eigenschaften der Blattgewebe und ihrer Funktionen ab. Der Teil des Lichtes, der auf das Blatt fällt, wird von ihm abgereflektiert (Abb.3.2.2). In der Physik unterscheidet man zwischen der Spiegel- (an glänzenden Oberflächen) und der diffusen Reflexion. Die Blätreflexion erklärt sich hauptsächlich durch diffuse Reflexion.

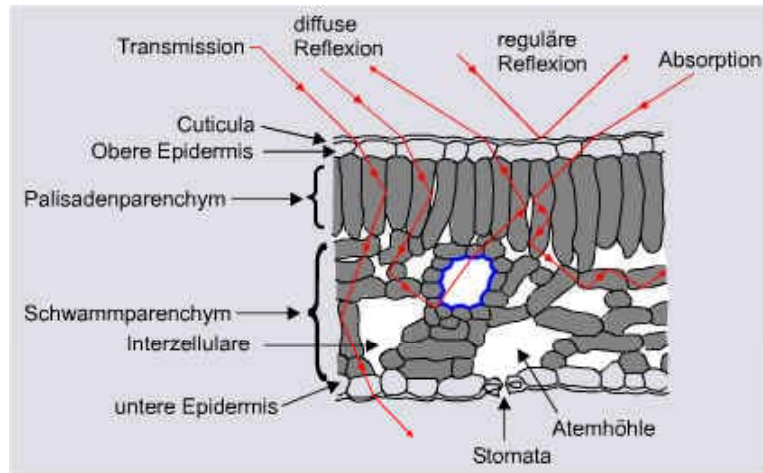


Abb.3.2.2: Lichtbewegung im Blatt.

Ein Teil des in ein Blattgewebe eindringenden Lichtes wird an Blattstrukturen gestreut, ein weiterer Teil wird hauptsächlich durch das Chlorophyll und Wasser absorbiert und zum Großteil für den Energiehaushalt der Pflanze umgesetzt. Der zurückgehaltene Anteil der Strahlung wird als Extinktion und der unverändert durchgehende als Transmission bezeichnet. Der Rest wird wieder emittiert. Die emittierte Strahlung zusammen mit der an der Oberfläche reflektierten Strahlung bezeichnet man als Remission.

Abb.3.2.3 stellt unterschiedliche Prozesse dar, die von der eingestralten Lichtenergie im Blatt aufgelöst werden können. Aus ihrem räumlichen und zeitlichen Verlauf können Rückschlüsse auf verschiedene Prozesse im Blatt gezogen werden. Alle "Ausgänge" tragen Information über die Blattfunktion und den Blattaufbau.

Grundsätzlich können zwei große Gruppen von Wechselwirkungsprozessen im Blatt unterschieden werden. Sie werden als photochemische und thermische Prozesse, bezeichnet. Photochemische Prozesse (Photosynthese, Photomorphogenese) bewirken eine chemische Veränderung eines Moleküls. Thermische Effekte entstehen durch das Gewebes-Aufheizen. Dabei wird das absorbierte Licht bei der Rückkehr der angeregten Elektronen in den Grundzustand in die Vibrationsenergie umgewandelt - es entsteht Wärme.

Reflektiertes und transmittiertes Licht eignen sich gut für strukturanalytische Zwecke. Für die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung vom Gewebe ist der Anteil des Lichtstrahles entscheidend, der im Gewebe deponiert wird. Dies geschieht im wesentlichen durch die Absorption der Photonen an den Atomen und Molekülen.

In optisch homogenen Medien ist die Bestimmung des absorbierten Lichtanteils vergleichsweise einfach (Kapitel 2.1.1). Dieser entspricht im wesentlichen dem Lichtanteil, um den der ursprüngliche Lichtintensität geschwächt wurde. Pflanzliche Gewebe sind jedoch optisch inhomogen. Mehrfache Lichtstreuung innerhalb des Gewebes führt ebenfalls zu einer Schwächung der ursprünglichen Lichtintensität. Eine einfache Bestimmung der Absorption ist daher nicht möglich. Die beiden entscheidenden optischen Eigenschaften - Absorption und Streuung - sollen bei Spektraluntersuchungen der Pflanzengewebe berücksichtigt werden.

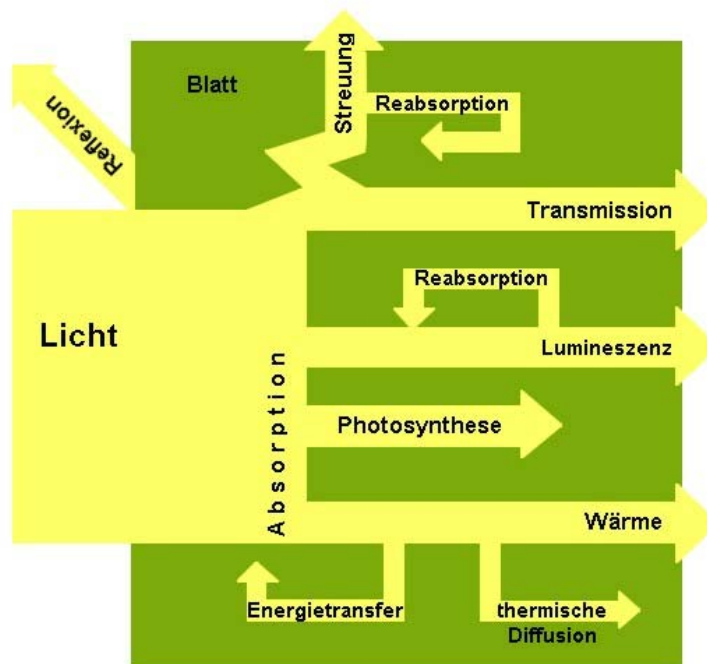


Abb.3.2.3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Prozesse der Lichtbewegung und -umwandlung im Blatt.

Lichtabsorption im Blattgewebe

Zunächst wird die Lichtabsorption im Blattgewebe beschrieben werden und die Streuung bleibt zunächst unberücksichtigt. Die Lichtabsorption A in einer homogenen Probe wird durch den Absorptionskoeffizienten μ_a charakterisiert. Dieser beschreibt, wieviel Photonen innerhalb einer definierten Wegstrecke bei einer vorgegebenen Wellenlänge absorbiert werden. Der Zusammenhang zwischen dem Absorptionskoeffizienten μ_a , der einfallenden Lichtintensität I_0 , der Lichtintensität des geschwächten Strahls I , sowie der Konzentration der Absorber c und der Schichtdicke d der Probe wird durch das Lambert-Beerschen Gesetz (Kapitel 2.1.1) beschrieben:

$$I = I_0 \exp(-\mu_a c d)$$

Die Intensitätsschwächung in absorbierenden Medien ist somit durch eine Exponentialfunktion charakterisiert. Diese definiert auch die räumliche Verteilung der absorbierten Lichtmenge im Blattgewebe. Die meiste Lichtenergie wird direkt an der Oberfläche absorbiert. Danach fällt die Intensität mit der Tiefe des Blattgewebes steil ab.

Mehrfache Lichtstreuung im Blatt

In dichten strukturierten Objekten wie Pflanzenblätter findet komplizierte Art der mehrfachen Lichtstreuung (MLS) statt, als Ergebnis der mehrfachen Streuung-, Reflexion- und Brechung-Prozesse an Blattstrukturen und Komponenten. Das Licht wird bei der Transmission durch das anisotrope Blattgewebe stark gestreut und seine Richtung wird mehrfach geändert. Es ist damit verbunden, daß es sowie auf der Oberfläche, als auch im Blattinneren mehrere Grenzschichten (Cuticula, Epidermis, Palisaden- und Schwammzelle, Interzellulare) gibt, die verschiedene Brechungsindizes

n haben. Die ähnlichen Effekte geschehen beim Durchgang des Lichtes durch die Zelle: die Unterschiede in den Brechungsindizes zwischen der Luft ($n \approx 1,0$), der flüssigen Phase von Protoplasten ($n \approx 1,36$), der Zellwänden ($n \approx 1,42$), die Lichtstreuung auf den Chloroplasten und anderen Organellen sowie auf den Subzellenstrukturen. Das Resultat ist die mehrfache Lichtstreuung im Blatt und mehr oder weniger komplexe Richtungsverteilung des gestreuten Lichtes. Damit sind die optischen Wege des Lichtes im Vergleich zu der geometrischen Blattdicke wesentlich vergrößert. Deshalb wird das Licht im Gewebe stark reabsorbiert und so absorbieren die Blätter viel mehr Licht als die extrahierten Blattpigmente oder isolierten Chloroplasten. Die Untersuchung der MLS-Prozesse im Blatt ist sehr wichtig für die Klärung der gesamten optischen Eigenschaften von Pflanzenblättern.

Anisotropie des Lichtes im Blattgewebe

Analog zum Absorptionskoeffizienten wird der Streukoeffizient für die Beschreibung des wellenlängenabhängigen Streuverhaltens benutzt. Der Streukoeffizient μ_s ist als die Anzahl der gestreuten Photonen pro Zentimeter (Stöße/Zentimeter) definiert. Der Absorptions- und der Streukoeffizient geben somit Aufschluß darüber, wieviel Photonen in einer Schichtdicke in Wechselwirkung mit der Materie treten. Eine genaue Theorie ist nur für die Einfachstreuung an Molekülen sowie für kugelförmige mikrometerkleine Teilchen bekannt, das heißt für die sogenannte *Rayleigh- und Mie-Streuung* (Kapitel 2.1.3). Die Strukturen im Blattgewebe sind in der Regel weder kleiner als die Wellenlänge des Lichtes noch kugelförmig. Eine allgemeingültige Beschreibung der MLS-Prozesse im pflanzlichen Gewebe existiert derzeit nicht.

Für die Wirkung vom Licht auf das Pflanzenblatt ist eine genaue Kenntnis der Lichtverteilung im Gewebe erforderlich. Für reine Absorptionsvorgänge ist die räumliche Verteilung durch das Lambert-Beersche Gesetz vorgegeben. Nach einem Streuvorgang kann das Photon beliebige Raumrichtung einschlagen. Im Gegensatz zum Absorptionskoeffizienten beschreibt der Streukoeffizient die räumliche Verteilung des Lichtes nur unzureichend. Ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein Photon in eine bestimmte Raumrichtung gestreut wird, für alle vorhandenen Sektoren eines Raums gleich, so spricht man von einem isotropen Streuer. Die Streuung im pflanzlichen Gewebe ist hauptsächlich vorwärts gerichtet. Ein solches Medium, das in eine bevorzugte Richtung streut, bezeichnet man als einen anisotropen Streuer. Im Blatt unterscheidet man kontrastierende optische Eigenschaften des Palisaden- und Schwamm-Mesophylls. Phloem- und Xylem-Gewebe der Blattadern weisen stärkere Anisotropie im Vergleich zum Mesophyll auf.

Strahlungs-Transport-Gleichung

Die Lichtverteilung im Blattgewebe kann mittels der Rayleigh- und Mie-Streuung nur teilweise beschreiben werden. Man bedient sich deshalb phänomenologischer Modelle, die sich auf einer Strahlungs-Transport-Gleichung gründen. Diese beschreibt, ähnlich wie das Lambert-Beersche Gesetz, das im Gewebe absorbierte Licht in einer definierten Schichtdicke. Diese im Gewebe "verlorene" Lichtintensität $-dI$ entspricht hierbei der ursprünglichen Lichtintensität I mal einem Schwächungs- bzw. Extinktionskoeffizient μ_e : $\mu_e = \mu_a + \mu_s$ ist die Summe aus dem Absorptionskoeffizienten μ_a und dem Streukoeffizienten μ_s , das heißt Absorptions- und Streukoeffizient können als Extinktionskoeffizient zusammengefaßt werden, welcher die Verluste pro definierte Wegstrecke für das transmittierte Licht beschreibt.

Strahlungs-Transport-Gleichung wird damit wie folgt definiert: $-dI = \mu_e I dx - j dx$

Diese Gleichung beschreibt den Lichtverlust entlang einer Wegstrecke dx . Der Streukoeffizient μ_s beschreibt alle Streustöße, die entlang dieses Weges auftreten, d.h. auch die Stöße der Photonen, die in einer anderen Raumrichtung wieder auftreten und somit nicht zur tatsächlichen Lichtschwächung in Richtung x beitragen. Letztere müssen von dem Gesamtbetrag der Lichtschwächung wieder abgezogen werden. Dies geschieht mit Hilfe der Funktion j , die ein Produkt aus dem Streukoeffizienten und der Streufunktion ist, wobei diese über alle betroffenen Raumwinkel integriert werden muß. In dieser Strahlungs-Transport-Gleichung ist also der Absorptionskoeffizient μ_a , der Streukoeffizient μ_s sowie die räumliche Verteilung der gestreuten Lichtintensität enthalten. Somit eignet sich diese Betrachtungsweise zur Beschreibung der Lichtverteilung im Blattgewebe.

Spektrale Lichtverteilung im Blattgewebe

Die optischen Charakteristika der Blätter sind durch eine spezifische, dynamische und fein organisierte Struktur bedingt. Spektrale Charakteristika von Pflanzenblättern sind hauptsächlich durch das Pigmenten- und Wassergehalt bedingt. Die spektrale Lichtverteilung im Blattgewebe hängt primär davon ab, ob die Streuung oder die Absorption überwiegt. Grundsätzlich besitzt jede biologische Struktur die ihr spezifischen Streu- und Absorptions-Charakteristika. Unabhängig von der absoluten Höhe der Koeffizienten tritt jedoch in bestimmten Spektralbereichen typischerweise eher Streuung oder Absorption auf.

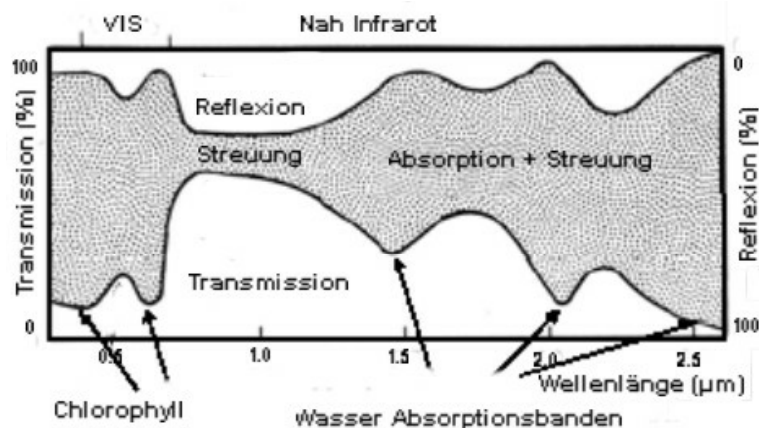


Abb.3.2.4: Spektrale Lichtverteilung in einem Pflanzenblatt.

Im ultravioletten Spektralbereich sind beide Interaktionsmechanismen gleichermaßen vertreten, wobei die Absorption in der Regel vorherrscht, die überwiegend durch die Elektron-Absorptionsbanden von Wasser, Proteinen und Nucleinsäuren bedingt ist. In sichtbaren Spektralbereichen bei 400 - 500 und 620 - 690 nm absorbieren *Chlorophyll a* und *b* stark und in anderen VIS-Spektralbereichen beherrscht die Streuung dagegen die Lichtverteilung im Gewebe (Abb.3.2.4). Dies trifft ebenfalls noch in Teilen des Nahinfrarot bis etwa 1200 nm zu. Danach steigt die Wasserabsorption wieder an, so daß im Spektralbereich von etwa 1200 bis 1800 nm wieder beide Mechanismen zum Tragen kommen. Oberhalb von 1800 nm steigt die Wasserabsorption steil an.

3.2.3. Blattoptik Modelle

Strahlungstransportmodelle sind eine Voraussetzung für die Interpretation optischer Eigenschaften vom Pflanzenblatt. Eine allgemeingültige Beschreibung von Prozessen der Blattoptik existiert derzeit nicht. Trotz der großen Komplexität gibt es bereits die Versuche, die Wechselwirkung des Lichtes mit dem Blatt modellieren. Dies sind nur erste Schritte in Richtung der Entwicklung eines optischen Blattmodells. Um die Lichtverteilung im Blattgewebe besser zu verstehen, bedient man sich spezieller Modelle und Computersimulationen [Gausman 1985, Krulik 1980, Lee 1986, Mandoli 1983, McClendon 1984].

Für die Analyse der Wechselwirkung der Strahlung mit Vegetation wurde eine Reihe der Methoden entwickelt. Maier und Anisimov entwickelten ein *stochastisches Modell*, daß die optischen Eigenschaften vom Blatt modelliert und die Reflexion, Transmission, und Absorption vom Licht im Spektralbereich von 400 nm bis zu 2,5 µm berechnet [Maier 1999, Anisimov 1992]. Das Modell behandelt die Übertragung der Diffusstrahlung nach der *Theorie der homogenen Markov-Ketten*, um die spezifischen Absorptionsspektren von Chlorophyll a und b in vivo abzuleiten. Mit diesem Modell wurde auch das Reflexionsvermögen der oberen und unteren Blattseite errechnet und die typischen Unterschiede bestätigt, die man bei den Messungen auch beobachtet.

Ein weit verbreitetes Modell für die Beschreibung der optischen Eigenschaften eines dichten Mediums wie ein Pflanzenblatt ist die *Monte Carlo Simulation* [Johansson 1999, Huffer 1998, Nackaerts 1999]. Der Computer "startet" eine definierte Photonen-Anzahl. Anschließend wird mit Hilfe der bekannten Streu- und Absorptionskoeffizienten und der Phasenfunktion die Wahrscheinlichkeit für jedes einzelne Photon berechnet, in einem definierten Raumwinkel gestreut zu werden. Nach einer vorher definierten Anzahl von Streu- und Absorptionsprozessen wird dann das Programm beendet. Das Ergebnis entspricht dann der zu diesem Zeitpunkt zu erwartenden Photonenverteilung im Gewebe.

Die Kirchhof-Theorie für die Beschreibung der einfachen Streuung und die Strahlungstransport-Theorie für die Mehrfachlichtstreuung im Blatt wurden angewendet [Ma 1990]. Es wurden auch die Auswertungen mittels der *Gurevitsch-Kubelki-Munka* Methode für die Berechnung der Integralcharakteristiken der Lichtstreuung an Phytoelementen wurden durchgeführt [Myers 1968, Krulik 1980].

Für das Studium der Winkelabhängigkeit sowie der Spektralverteilung der Streuung und der Absorption in den Blättern wurde auch die Mie-Streuung-Theorie und die Strahlungstransportstheorie verwendet [Berdnik 2001]. Die Strahlungstransporttheorie benutzt die Lösung der Integral-Differential-Gleichung des Strahlungstransportes für das Blattgewebe. Dabei wurde ein zweischichtiges Modell der Lichtstreuung und der Lichtabsorption an Blatt-Phytoelementen entwickelt, das sowohl die Pigmenten- und Wasserabsorption als auch die Streuung an zwei Teilchenarten (Chloroplasten und Luft-Interzellularen) berücksichtigt. Mit diesem Modell können die Spektralabhängigkeiten der Reflexions- und Transmissionskoeffizienten je nach der Blattstruktur berechnet werden. Solche Beispiele zeigen die Möglichkeit, derartige Methoden für die Lösung der direkten und inversen Aufgaben in der Blattoptik zu verwenden.

Eine theoretisch-experimentelle Methode wurde ebenfalls entwickelt, die die Bestimmung der optischen Parameter und Lichtintensitäten in verschiedenen Tiefen sowie die Weglängenverteilung des Lichtes erlauben [Fukschansky 1992, Martinez 1992]. Diese Methode berücksichtigt die Vielschichtigkeit und andere Charakteristika der Gewebe sowie die räumliche Heterogenität des Pigments. Außerdem versucht man durch die Überlagerung der Lichtgradienten mit den Gradienten der photosynthetischen Kapazität der Chloroplasten einen ersten Einblick in die räumliche Struktur der Blattphotosynthese zu gewinnen.

Bedeutende Erfolge im Verständnis der Blattoptik wurden in den letzten Jahren dank der Verwendung der Glasfasertechnik erreicht. Eine Mikrofaser (mit dem Durchmesser weniger als 5 μm) kann ins Gewebe eingeführt und damit die Lichtregimes unmittelbar im Blattinneren erforscht werden [Vogelmann 1983]. Mit Hilfe dieser Methoden wurde das Durchdringen des Lichtes der verschiedenen Wellenlängen in die Blattiefe untersucht und die Lichtgradienten innerhalb der Blätter verschiedener Arten quantitativ beschrieben [Vogelmann 2000]. Die Messungen mit Hilfe dieser Technik haben auch viele andere wichtige Effekte gezeigt [Karabourniots 1999]. Laut den Experimenten, die mit den Mikroglasfasern durchgeführt wurden, funktionieren die etiolierten (pigmentarmen) Pflanzengewebe als eine Art optischer Lichtleiter. Diese gewährleisten ein Durchdringen des Lichtes zu den Teilen des Keims und eine Einschaltung der Photomorphogenese-Prozesse.

Es wurde entdeckt, daß obere Epidermiszelle bei vielen Pflanzenarten fähig sind, das Licht zu fokussieren. Die Lichtintensität steigt dabei um 15-20fache im Vergleich zu dem Licht, das auf die Blattoberfläche fiel [Fukshansky 1992]. Die physiologische Rolle dieses Effektes ist noch nicht endgültig geklärt, es ist aber wahrscheinlich, daß es die Verteilung und die Absorption der photosynthetischen Strahlung im Blatt stark bestimmt.

Die meisten optischen Blattmodelle, wie bereits existierten Stochastische- und Monte-Carlo-Modelle, benutzten mehrere Näherungen. Diese Ansätze arbeiten bei einer Reihe von Problemstellungen effizient, sind jedoch für die Erklärung der Blattoptik noch nicht ausreichend weit entwickelt. Zusätzlich sind die meisten theoretischen Modelle auf bestimmte Bedingungen beschränkt. Aber es gibt noch keine mehr oder wenig vollständige Theorie der Blattoptik und alle existierende Modelle erklären nur ein Teil von beobachteten optischen Charakteristika des Blattes. Die Antworten auf viele Fragen, die ein besseres Verständnis der optischen Blatteigenschaften erlauben würden, stehen noch bevor.

Eine Entwicklung der Bildverarbeitungsmethoden ermöglicht, neue wichtige und interessante Informationen über die Besonderheiten der optischen Prozesse im Blatt zu gewinnen. Empirische Daten, die aus der spektralen Bildverarbeitungsverfahren am Pflanzenblatt ermittelt wurden, können als Grundlage zur Deutung von physiologischen Prozessen in Pflanzen verwendet werden.

3.3. Pflanzenblatt als photosynthetisches System

3.3.1. Photosynthese als Energieumwandlung

Unter Photosynthese bezeichnet man einen biologischen Prozeß, bei dem die Lichtenergie durch Photopigmente absorbiert und in chemisch gebundene Energie transformiert wird. Die Photosynthese ist eine energetische Grundlage von allen biologischen Prozessen, ein energetischer Motor der Biosphäre. Pflanzen sind die photoautotrophen Organismen, die die anorganischen Rohstoffe (CO_2 , H_2O) aus der Umwelt aufnehmen und daraus organische Moleküle (Kohlenhydrate) herstellen. Gesamtbilanz der Photosynthese lautet :



wobei $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ein Kohlenhydrat – Glykose ist.

Der wichtigste Ort der Photosynthese ist bei meisten Pflanzen das Blatt. Die Photosynthese kann man als eine Reihe von physiologischen Prozessen in den Pflanzen beschreiben:

- Absorption, Umwandlung und Speicherung der Sonnenenergie, infolge dessen aus den primären Stoffen - CO_2 und H_2O - die energiereichen Kohlenhydrate synthetisiert werden und Sauerstoff produziert wird;
- Mikroskopisch kleine Spaltöffnungen lassen CO_2 ein- und O_2 austreten;
- Über Xylem gelangt das von Wurzeln aufgenommene Wasser in die Blätter;
- Über Phloem werden die Assimilate von den Blättern zur Wurzel und in andere Pflanzenteile transportiert.

Photosynthese als ein biophysikalisch-chemischer Prozeß läßt sich in zwei Abschnitte unterteilen:

- **Lichtreaktion**, der Photo-Teil, bei dem im wesentlichen biophysikalische Vorgänge ablaufen (Photonenabsorption, Elektronenanregung und -übertragung). Dabei wird die Lichtenergie in die chemische Energie umgewandelt.
- **Dunkelreaktion**, der sogenannte Calvin-Zyklus, der Synthese-Teil, bei dem im wesentlichen biochemische Vorgänge ablaufen und Kohlenhydrate (Glykose) entstehen.

Die Begriffe Licht- und Dunkelreaktionen bedeuten, daß diese Teil-Reaktionen auf einer Seite "lichtabhängig" (Lichtreaktion) und auf anderer Seite "lichtunabhängig" (Dunkelreaktion) ablaufen. Jedoch können beide Reaktionen gleichzeitig tagsüber laufen. Wie Abbildung 3.3.1. verdeutlicht, sind Licht- und Dunkelreaktionen eng miteinander verbunden.

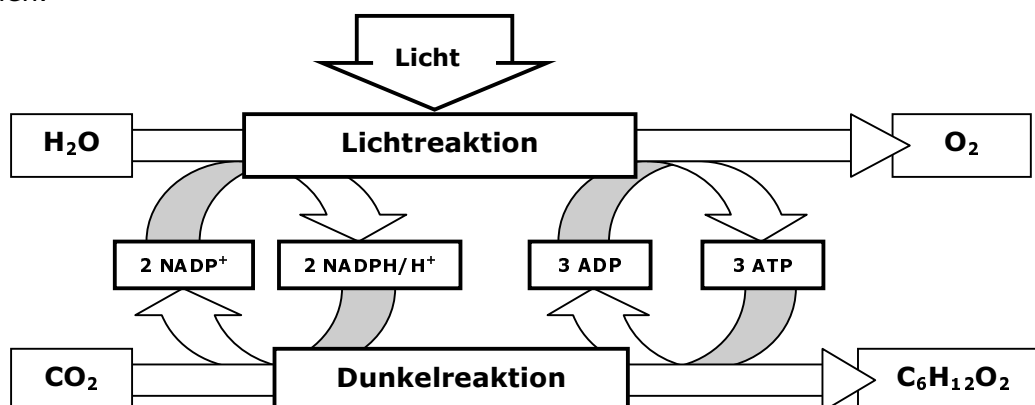


Abb.3.3.1: Zusammenwirken von Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese.

Lichtreaktion

Bei der Lichtreaktion wird die Strahlungsenergie in die chemische Energie umgewandelt. Diese Umwandlungen erfolgen bei Reaktionen, die an großen Enzymkomplexen in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten ablaufen. Die dabei ablaufenden Prozesse sind:

- Wasserspaltung (Photolyse des Wassers)
- ATP-Bildung (Photophosphorylierung)
- Reduktion von NADP^+ zu NADPH/H^+

Durch die Aufnahme der Lichtenergie werden zwei Elektronen aus dem Photopigment *Chlorophyll* ausgestoßen. Diese freigesetzten Elektronen hinterlassen eine Elektronenlücke im Reaktionszentrum, die einen Elektronentransport von einem Wassermolekül zu einem NADP^+ Molekül zur Folge hat. Der entscheidende Aspekt dabei ist, daß ein *Photonenfluß* in einen *Elektronenfluß* umgewandelt wird. Wasser liefert die Elektronen, während das Coenzym NADP^+ als Elektronenakzeptor fungiert. Der Elektronentransport erfolgt über eine Elektronentransportkette. Dabei wird die Energie "portioniert", die zur Photophosphorylierung genutzt wird, um eine Phosphatgruppe an ADP zu binden und damit ATP zu erzeugen. Generell wird während der Lichtreaktion die Energie des absorbierten Lichtes genutzt, um die chemischen Substanzen ATP und NADPH/H^+ herzustellen, die im Calvin-Zyklus weiterverwendet werden. Dabei wird durch die Wasserspaltung (Photolyse) molekulares Sauerstoff in die Atmosphäre freigesetzt.

Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus)

Während der Dunkelreaktion werden Kohlenhydrate durch eine Reduktion von Kohlenstoff produziert. Der Zyklus beginnt mit der CO_2 -Fixierung aus der Luft. Zuerst wird Kohlendioxid von einem Akzeptor gebunden. Der gebundene Kohlenstoff wird dann durch die Aufnahme von Elektronen zum Kohlenhydrat reduziert und anschließend wird CO_2 in *Glucose-6-Phosphat* umgewandelt. Da Glycosemolekül aus 6 C-Atomen besteht, werden für seine Synthese 6 Moleküle CO_2 benötigt. Das Reduktionsmittel NADPH/H^+ wird dabei zu NADP^+ oxidiert. Die benötigte chemische Energie liefert das in der Lichtreaktion gebildete ATP.

Chloroplasten - Ort der Photosynthese

Die Photosynthese der grünen Pflanzen findet in den Chloroplasten statt (Abb.3.2.2). Typische Mesophyllzelle des Blattes enthält 30-40 Chloroplasten, aber die meisten Chloroplasten, bis 400 pro Zelle, befinden sich in Palisadenparenchym. Die Berechnungen für Rizinusblatt zeigen, daß etwa 82 % der Chloroplasten dem Palisadengewebe angehören.

Aufbau der Chloroplasten

Chloroplasten sind linsenförmige Zellorganelle (ca. 6 μm). Im Inneren des Chloroplastes befindet sich eine 7 nm dicke Doppellipidschicht, die als *Thylakoidmembran* bezeichnet wird. Das *Stroma*, eine wiskose Flüssigkeit, ist von zwei Thylakoidmembranen umgeschlossen. An manchen Stellen bilden die Thylakoide geldrollenartige Stapel, diese nennt man Grana. Ein komplexes System von Thylakoidmembranen trennt das Stroma von Thylakoidinnenraum. Die Photopigmente befinden sich in den Thylakoidmembranen (Abb.3.3.2).

Thylakoide enthalten die Komponenten des Photosyntheseapparates, die für die Energieumwandlung zuständig sind: die lichtsammelnden Proteine, die Pigmentenkollektive der Photosysteme I und II, die Proteinsysteme des Elektronentransportes, das Elektroenzym ATPase [Renger 1987]. Das Stroma enthält die Komponenten, die für die Substanzumwandlung zuständig sind: Enzyme des Calvin-Zyklus und Enzyme weiterer Stoffwechselprozesse.

Die isolierten Chloroplasten erzeugen bei der Belichtung Sauerstoff und Kohlenhydrate, sie können also auch außerhalb der Zelle photosynthetisch aktiv sein. Sie enthalten alle Enzyme, die für die Durchführung der Photosynthese notwendig sind.

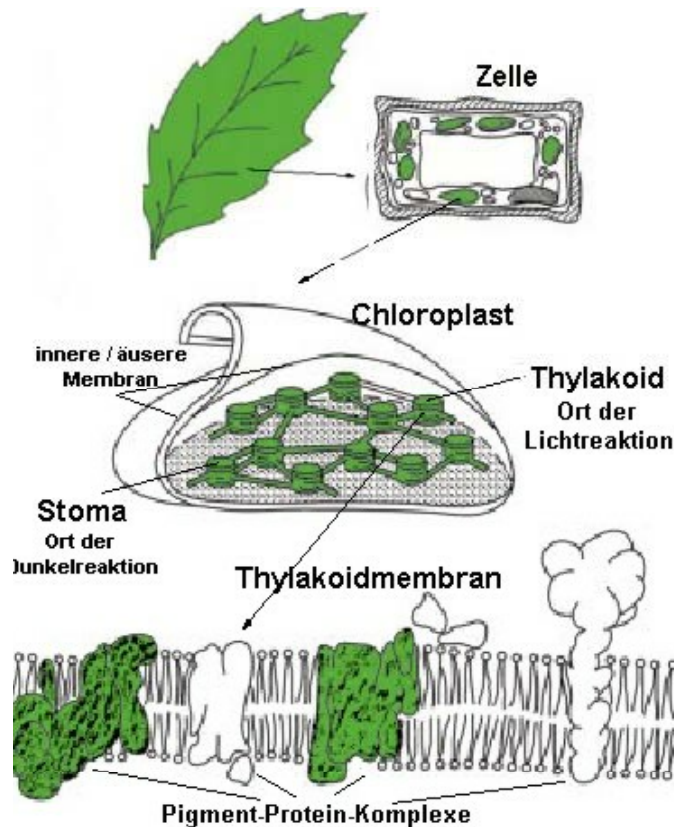


Abb.3.3.2: Lokalisierung des Photosyntheseapparates im Pflanzenblatt.

3.3.2. Photosynthesepigmente

Photosynthese beruht im Wesentlichen auf dem Elektronentransport. Dazu muß Sonnenlicht in den Zellen von Pflanzen Elektronen freisetzen. Dies geschieht über Pigmente, die in charakteristischen Wellenlängen absorbieren. Die Photosynthese stellt einen komplexen Vorgang dar, bei dem mehrere Pigmente beteiligt sind. Die pflanzliche Photopigmente lassen sich in zwei Kategorien einteilen:

primäre Photosynthesepigmente, die die Lichtenergie aktiv absorbieren und direkt am photochemischen Prozeß beteiligt sind:

- *Chlorophyll a* [Absorptionsmaxima bei 430 und 680 nm]

akzessorische Pigmente (Hilfspigmente), die die Lichtsammlung übernehmen und damit den Wirkungsgrad beim "Einfangen" von Lichtquanten erhöhen und das photosynthetische Apparat vor Photozerstörung schützen:

- *Chlorophyll b* [Absorptionsmaxima bei 450 und 680 nm]
- *Carotinoide* (Carotine, Xanthophylle) [mehrere Absorptionsmaxima von 380 bis 550 nm]

Der wichtigste Photorezeptor der Photosynthese ist Chlorophyll, das eigentlich ein Farbstoffgemisch aus zwei Komponenten ist: *Chlorophyll a* und *Chlorophyll b*, die etwa in einem Mengenverhältnis von 3:1 auftreten. Sowohl die Strukturformel (Abb.3.3.3) als auch das Absorptionsspektrum (Abb.3.3.4) vom *Chlorophyll b* ähneln denen vom *Chlorophyll a*.

Chemischer Aufbau des Chlorophyll-Moleküls

Das Chlorophyll ist ein grüner Pflanzenfarbstoff, der mit dem roten Blutfarbstoff *Hämin* chemisch verwandt ist. Es sind Mg-Komplexe, die sich vom Porphin ableiten. Der wichtigste Bestandteil des Chlorophylls ist der *Porphyrinring* mit dem Magnesium-Ion $Mg(2+)$ als Zentralion (Abb.3.3.3). Dieser "Kopf" des Chlorophyllmoleküls ist der entscheidende Teil für die Lichtabsorption. Im Porphyrin – dem Ringsystem mit seinen zahlreichen konjugierten Doppelbindungen – sind zahlreiche lockere π -Elektronen vorhanden, die bereits von relativ langwelligem Licht angeregt werden. An den Kopf ist eine *Phytolkette* gebunden. Das ist ein langkettiger Alkohol. Damit wird das Molekül in der Thylakoidmembran verankert. Da der Porphyrinring hydrophile Eigenschaften zeigt, besitzt das Chlorophyll-Molekül auch einen polaren Charakter. Dies ist bedeutungsvoll für die Orientierung der Moleküle in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten.

Chlorophyll a und *b* unterscheiden sich nur in einer der funktionellen Gruppen am Porphyrinring. Diese funktionellen Gruppen sind an der Stelle, die mit "R" (für Rest) gekennzeichnet ist, mit dem Porphyrinring verknüpft.

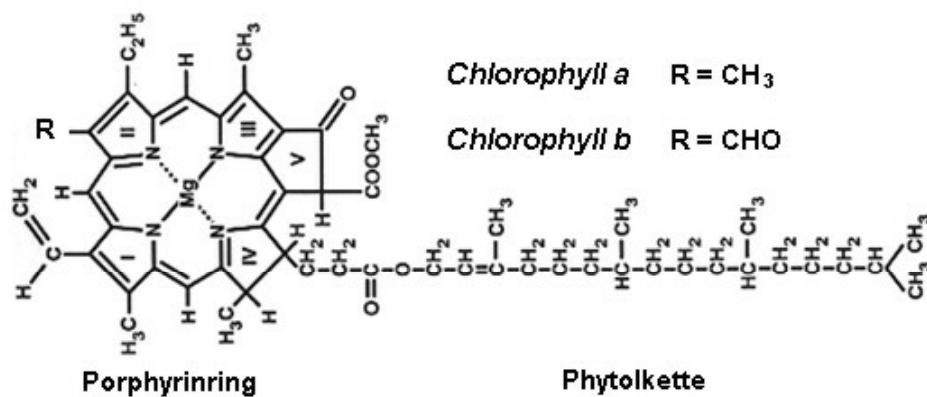


Abb.3.3.3: Strukturformel von Chlorophyll a und b.

Photosysteme

Durch die Versuche wurde bewiesen, daß mehrere hundert Chlorophyllmoleküle benötigt werden, um ein Sauerstoffmolekül aus einem Photon zu produzieren [Bowers 1967]. Dieses Ergebnis zeigt, daß der überwiegende Pigmenten-Teil als *Lichtfalle* wirkt, die dafür sorgt, daß Photon zu einem *Reaktionszentrum* transferiert wird, in dem schließlich die Lichtenergie in die chemische Energie umgewandelt wird. Einen solchen Komplex aus hunderten von Chlorophyllmolekülen, an dem aber auch andere Pigmente und Proteine beteiligt sind, nennt man eine photosynthetische Einheit. Diese Zusammenarbeit der Pigmente in einer Einheit führt zu einer besonders effizienten Ausnutzung des eingestrahnten Lichtes.

Experimente zeigen, daß es zwei photochemische Ereignisse gibt, die zwar mit unterschiedlichen Pigmentsystemen arbeiten aber miteinander kooperieren:

- Photosystem I (PS I) für Licht längerer Wellenlängen (> 700 nm)
- Photosystem II (PS II) für Licht kürzerer Wellenlängen (< 680 nm)

Bislang ist es noch nicht geklärt, wie die beiden Systeme miteinander kooperieren und wie sie mit der ATP- und NADPH-Bildung zusammenhängen. Die beiden Photosysteme sind in Serie geschaltet und beide sind notwendig, damit die Photosynthese vollständig abläuft. Das Reaktionszentrum jedes Photosystems wird durch je ein Molekül Chlorophyll a repräsentiert (Chl 700 für PS I und Chl 680 für PS II).

3.3.3. Spektroskopie der Pflanzenblätter im VIS Bereich

Spektroskopie der Photosynthesepigmente

Die Spektralcharakteristika von Chlorophyll sind durch sein Molekularaufbau bedingt. Der aus vier aromatischen, heterozyklischen Fünfringen gebildete Porphyrinring besitzt 11 konjugierte Doppelbindungen mit leicht anregbaren π -Elektronen (Abb.3.3.3). Dieser Molekülabschnitt ist daher maßgeblich für die Lichtabsorption und Farbigekeit verantwortlich. Die π -Elektrone absorbieren vor allem Lichtquanten der Wellenlängen 430 bis 470 nm (blaues und blaugrünes Licht) sowie 640 nm bis 660 nm (oranges und rotes Licht). Durch die Absorption eines Lichtquanten können Elektronen auf das energetisch höherliegende Orbital gebracht werden.

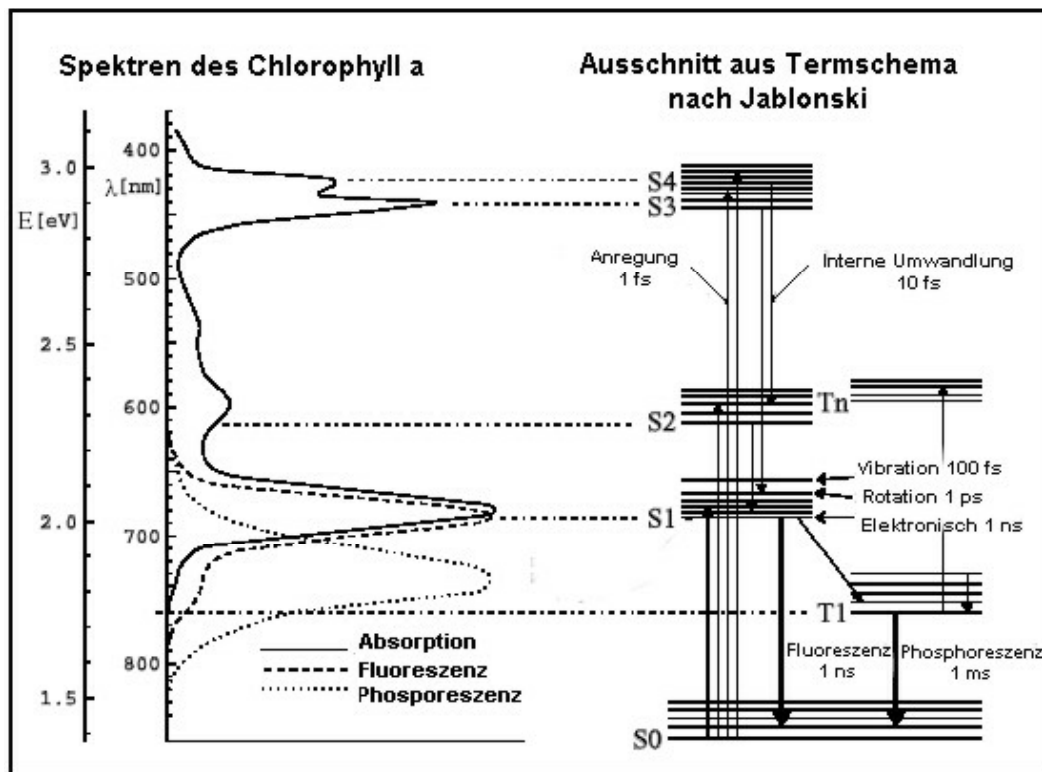


Abb.3.3.4: Schematische Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren von Chlorophyll a (links) und das Termschema der elektronischen Zustände (rechts).

Das Absorptionsspektrum von *Chlorophyll a* ist in Abb.3.3.4 dargestellt. Es besitzt zwei ausgeprägte Maxima bei 450 und 680 nm. Diese entstehen durch den Übergang vom Grundzustand S_0 zu höheren Singuletzuständen S_n (Jablonski-Diagramm, rechts in Abb.3.3.4). Man stellt fest, daß der Bereich größter photosynthetischer Aktivität und damit das Absorptionsmaximum im roten Bereich des Farbspektrums liegt. Blaue Strahlung wird ebenfalls sehr stark absorbiert, ist aber photosynthetisch etwas weniger wirksam. Höhere Anregungszustände können strahlungslos in den S_1 -Zustand übergehen oder durch einen Energietransfer auf Nachbarmoleküle deaktiviert werden. Die Übertragung des Anregungszustandes aus der Antenne in das Reaktionszentrum findet in Form einer *Exiton* vom S_1 -Zustand des Chlorophyllmoleküls statt [Dau 1996]. Insgesamt gibt es folgende Möglichkeiten, wie aus S_1 -Zustand der Grundzustand S_0 erreichen werden kann:

- durch die Übertragung der Anregungsenergie auf ein benachbartes Pigmentmolekül,
- über die thermische Deaktivierung durch Abgabe der Energie als Wärme,
- durch Fluoreszenz über Ausstrahlung einzelner Lichtquanten (Maximum bei 690 nm),

- indirekt als Phosphoreszenz über einen Tripletzustand (Maximum bei 740 nm).

Spektren des Blattes im visuellen Bereich

Ein Laubblatt erscheint sowohl im Auflicht als auch im Durchlicht grün. Dies läßt bereits einige Rückschlüsse auf das Reflexions-, Absorptions-, Transmissionsvermögen zu. Damit ein Blatt im Auflicht und Durchlicht grün erscheint, muß die auftretende Strahlung im Grünbereich des Spektrums nicht nur am stärksten reflektieren und transmittieren, sondern muß auch die Strahlung in den übrigen Spektralbereichen weitgehend absorbieren.

Absorptionsspektrum vom Blatt (Abb.3.3.5) und Wirkungsspektrum der Photosynthese zeigt tatsächlich, daß das blaue und rote Licht photosynthetisch besonders effektiv sind. Ein hohes Absorptionsvermögen wird im Ultraviolett und im sichtbaren Bereich durch Blattpigmente wie Chlorophyll, Carotin und Anthocyan hervorgerufen, welche elektronische Absorptionsbanden in diesen Regionen haben [Gates 1970]. Aus dem Diagramm ist es ersichtlich, daß Photosynthese auch außerhalb der Wellenlängen stattfindet, die von Chlorophyll a nicht absorbiert werden. Verantwortlich dafür sind die akzessorischen Pigmente, die den Primärpigmenten die Zubringerdienste leisten, indem sie dessen Absorptionslücken auffüllen und damit das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts der Photosynthese verfügbar machen.

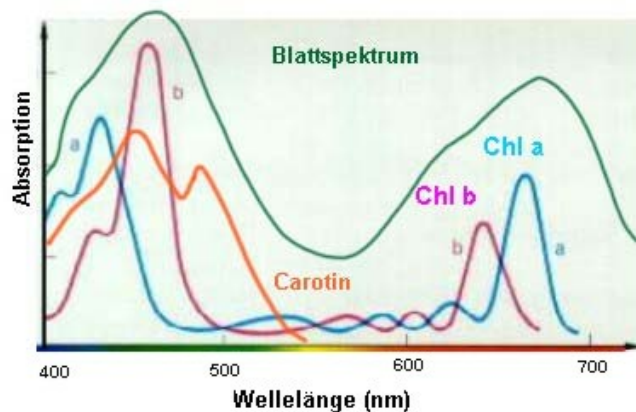


Abb.3.3.5: Absorptionsspektrum vom Blatt (Tabak) und seine Zerlegung in die Komponenten: Chlorophyll a, b und Carotin.

Durch die Mehrfachstreuung des Lichtes innerhalb des Blattes an Zellwänden und an mannigfachen Partikeln und Strukturen innerhalb der Zellen wird der Lichtweg verlängert und dadurch werden die Absorptionsbanden breiter und intensiver als diese für die extrahierten Photopigmente.

Lumineszenzprozesse im Blatt

Neben der Absorption ist auch die Fluoreszenz der Pigmente eine wichtige optische Eigenschaft des Pflanzenblattes. Die Fluoreszenz ist die Lichtabstrahlung nach der Lichtabsorption. Hervorzuheben ist das Pigment *Chlorophyll a*, welches bei 685 nm und 730 nm im Verhältnis 1:4 fluoresziert. Die Fluoreszenz von phenolischen Substanzen liegt zwischen 350 und 600 nm mit Maxima bei 440 nm (blau) und 540 nm (grün). Das meßbare Fluoreszenzemissionsspektrum eines Blattes wird wesentlich durch die Absorption der Farbstoffe beeinflusst, die ein Teil des innerhalb des Blattes emittierten Fluoreszenzlichtes reabsorbieren. Aus der Reabsorption kann man aber auch auf die Farbstoffkonzentration zurückschließen [Gitelson 1998].

Der Prozentsatz des über die Fluoreszenz abgestrahlten Lichtes liegt zwischen 3 und 7% bei intakten, photosynthetisch aktiven Blättern und 30 % bei isolierten Chloroplastenextrakten. Er hat eine messtechnische Bedeutung, weil er ein Maß für den

physiologischen Zustand und die Photosyntheseaktivität der jeweiligen Probe ist. Nach einer energetischen Abschätzung ist die Fluoreszenz von Chlorophyll a ungefähr 200 mal kleiner als die Absorption und spielt daher bei der passiven Fernerkundung eine untergeordnete Rolle [Gege 1994]. Bei der aktiven Fernerkundung ist durch gezielte Anregung der Pigmente mit Laserlicht eine Konzentrationsbestimmung der Pigmente durch Fluoreszenz möglich [Günther 1986]. Phosphoreszenz tritt sehr selten auf und ist unter normalen physiologischen Bedingungen kaum nachweisbar.

Bei Pflanzen ist die dunkelrote Chlorophyll-Fluoreszenz am besten untersucht. Daneben gibt es auch die in letzter Zeit stärker untersuchte Blau-Grün-Fluoreszenz, die von phenolischen Substanzen der Epidermis gemessen wird. In jüngster Zeit wurden *Lumineszenzbildanalyse* von Pflanzen durchgeführt. Dabei wird die Fluoreszenz von Pflanzen mit hochempfindlichen CCD-Kameras aufgezeichnet. Aus der Verteilung der Fluoreszenzintensität kann man auf Farbstoffzusammensetzung und eventuell auf Photosyntheseaktivität schließen [Buschmann 1998, Lichterthaler 1997].

3.4. Pflanzenblatt als wäßriges System

**«Wasser...es ist nicht so, daß man dich zum Leben braucht;
du selber bist das Leben!»** *Antoine de Saint Exupery*

Das Leben auf der Erde hat sich im Wasser entwickelt, und alle Lebensprozesse spielen sich im wäßrigen Medium ab. Die Pflanzen bestehen wie alle Organismen größtenteils aus Wasser. Ein Pflanzenblatt erhält im Durchschnitt 80-90% Wasser. So stellen die Kenntnisse zu Blattwasserhaushalt und -verteilung einen sehr wichtigen Sektor der Pflanzenkunde dar.

3.4.1. Wasser als physiologischer Faktor für Pflanzen

Die Umfassende Bedeutung von Wasser bei allen physiologischen Prozessen und Austauschvorgängen zwischen der Pflanze und ihrer Umwelt führt dazu, daß Überschuß und Mangel dieses universellen Lösungs- und Transportmittels für die Existenzbedingungen der Pflanzen entscheidend sind.

Wasser dient als Lösungsmittel für Mineralstoffe und ist das Medium für ihrer Fern- und Nahtransport in der Pflanze. Im wäßrigen Milieu des Protoplasmas finden die biochemische Reaktionen am Umsatz der organischen Struktursubstanzen statt. Wassermoleküle werden verbraucht oder bilden sich bei vielerlei Umsetzungen im Verlauf des dabei ablaufenden Auf-, Um- und Abbaus von organischen Molekülen. Wasser reguliert über die Hydratation und Quellung den Zustand der Zelle [Larcher 1994].

Wasser in Pflanzen übernimmt folgende wichtige Funktionen:

- Festigung des Pflanzenkörpers (Hydroskelett);
- Transportmittel (Assimilate, Nährstoffe);
- Elektronendonator (Wasserphotolyse bei Photosynthese);
- Ideales Lösungsmittel (Dipolcharakter vom Wasser);
- Reaktionspartner in Stoffwechselprozessen;
- Transpiration : Beteiligung an der Wärmeregulation;
- Auffänger der Endprodukte in Vakuole.

Wasserflüsse in Pflanzen

Eine Pflanze ist durch zwei Wasserflüsse mit ihrer Umgebung verbunden. Der eine ist die *Wasseraufnahme* durch die Wurzel und gegebenenfalls durch die andere Oberflächen, der zweite ist der *Wasserverlust* durch Transpiration und in einigen Sonderfällen die *Wasserabgabe* durch *Guttation*. Diese beide Wasserflüsse bestimmen die Wasserbilanz und damit der Wasserzustand der Pflanzen. Es läßt sich ein einfaches Bild der Transportvorgänge in der Pflanze aufstellen: Die Pflanze nimmt über die Wurzeln das Wasser und anorganische Nährstoffe auf. Über das Xylem werden diese zu den Blättern geleitet. Dort verdunstet das Wasser und verläßt das Blatt durch die Stomata. Der Wasserstrom im Xylem ist eine Folge der stetigen Abnahme des Wasserpotentials von der Wurzel bis zum Blatt.

Das Gefäßsystem ist auf rasche Weiterleitung und Verteilung des Wassers in gesamter Pflanze eingerichtet. Das Wasser wird hauptsächlich als Massenströmung in Gefäßleitung befördert. In den Blättern leitet sich die Xylembahnen auf feine Verästelungen auf, an deren tracheidalen Enden des Wassers vom

Gefäßbündelparenchym übernommen wird, von dort aus verteilt es sich durch Wasserverschiebung auf die Mesophyllzellen.

Wasserranpassung der Pflanze:

Xerophyten: Trockener Standort, Blätter klein und teilweise behaart, Cuticula dick, Stomata eingesenkt, großes Wurzelwerk.

Sukkulente: Sehr trockener Standort, dicke fette Blätter, Oberfläche allgemein verkleinert, speichern Wasser der Regenzeit und geben es langsam ab. Stomata nur nachts geöffnet.

Hydrophyten: Wasserleben, Blattoberfläche vergrößert, CO₂ an ganze Oberfläche aufgenommen, keine Stomata.

Hygrophyten: Feuchter Standort, große Blätter mit zarter Oberhaut um Transpiration zu erhöhen, Stomata herausgehoben.

3.4.2. Wasserverteilung im Blattgewebe

Abhängig vom Zelltyp und Zustand einer Pflanzenzelle kann ihr Wassergehalt von 60 bis 98% variieren. Im Mittel besteht ein Blatt zu 80 - 90 Gewichtsprozent aus Wasser. Auf das Volumen bezogen hängt der Wassergehalt stark vom zellulären Aufbau des Gewebes ab. Der heterogene Aufbau des Blattes hat zur Folge, daß auch das Wasser im Blatt sehr heterogen verteilt ist, so enthält z.B. 1 mm³ Schwammparenchym deutlich weniger Zellen (also auch weniger Wasser) als 1 mm³ des Palisadenparenchyms. Die der äußeren Epidermis unterlagerte Schicht besteht aus großen wasserspeichernden Zellen. In den einzelnen Abschnitten einiger Blätter wurde eine lineare Korrelation zwischen prozentualem Anteil an Parenchymgewebe und Wassergehalt ermittelt.

Die Kapazität, in den Vakuolen Wasser zu speichern, ist von der Molarität der darin gelösten Substanzen abhängig. Man spricht dabei vom osmotischen Wert (Osmolarität). Die Vakuolen parenchymatischer Zellen dienen als Depots für eine Reihe kleiner Moleküle. Aus der physikochemischen Bedingung folgt, daß gerade solche Zellen für eine hohe Wasseraufnahmerate prädestiniert sind. Neben den organischen Verbindungen speichern Parenchymzellen große Mengen an Wasser. In den meisten parenchymatischen Geweben, vor allem denen mit Speicherfunktion, gibt es nur kleine, teilweise sogar gar keine Interzellularen. Das ist durch den hohen osmotischen Druck (Turgor) der einzelnen Zellen, erklärbar.

Im Laufe der Entwicklung vom jungen, stark wachsenden zum ausgewachsenen Blatt ändert sich der Aufbau verschiedener Gewebeteile, was auch eine Änderung des relativen Wassergehalts zur Folge hat. So geht das Streckungswachstum mit einer Volumenzunahme der Zellen durch die Aufnahme von Wasser.

Sukkulente Blätter

Besonders augenscheinlich große Wassermenge (bis 98 %) erhalten Gewebe sukkulenter (dickfleischiger) Pflanzen (Kalanchoe, Aloe, Kakteen), wobei ganzer Pflanzenkörper oder Blätter als Wasserspeicher verwendet werden.

Funktion des Wassers in einer Zelle

In der Zelle kommt Wasser in verschiedenen Weise vor:

Konstitutionswasser: Wasser in chemische Bindungen fest gebunden, nicht verschiebbar;

Hydrationswasser: Quellungswasser an Ionen, Makromoleküle; nicht sehr fest gebunden;

Imbibitionswasser: Kapillarwasser in Mikrozweischenräumen zwischen Feinstrukturen;

Depotwasser: Wasser in Depoträumen (Vakuole);

Interstitielles Wasser: Transportwasser (Xylem, Phloem, Interzellularen) [Lösch 2001].

Eigentlich ist Wasser in Pflanzen nie frei verfügbar. Das ist eine Schutzvorrichtung, da es nie leicht abgegeben werden kann.

Hydrations- oder Quellungswasser

Bedingt durch ihren Dipolcharakter heften sich Wassermoleküle in flexiblen Clustern aneinander und an geladenen Oberflächen. Stark geladene Ionen in der Größenordnung von Wassermolekülen binden diese um so fester, je größer die Ladung und je kleiner der Radius des Ions ist. Unmittelbar an der Ionenoberfläche sind die Wassermoleküle durch das elektrostatische Feld des Ions stark gebunden und nahezu unbeweglich. Ganz ähnliche Verhältnisse herrschen an der Oberfläche von Eiweißmolekülen und Polysacchariden. Die Wassermoleküle lagern sich an polare Gruppen an und bauen mehrere übereinander liegende, nach außen immer leichter verschiebende Schichten strukturierten Wasser auf. Hydrationswasser macht nur 5-10 % des gesamten Wasser der Zelle aus, doch diese Menge ist unbedingt lebensnotwendig. Schon bei geringer Abnahme des Hydrationswassers kommt es zu schwerwiegenden Strukturstörungen des Protoplasmas.

Kapillarwasser

Der größere Teil des Quellungswassers im Protoplasma und in der Zellwand ist *kapillar* gebunden. Pflanzenzellwände ziehen je nach der Dichte der Fibrillenlagerung Wasser mit einem Sog von 1,5-15 Mpa an sich. Der Druck, mit dem das Wasser an der Oberfläche der Strukturelemente einer Matrix haftet, wird Quellungsdruck genannt.

Depotwasser

Am leichtesten beweglich ist das Wasser in den Kompartimenten der Zelle, die als Lösungsreservoir dienen. In den Blättern ist mehr als die Hälfte des vorhandenen Wasser auf diese Weise gespeichert. Auch dieses Wasser ist nicht vorkommen frei verfügbar, es ist osmotisch an gelöste Stoffe wie Zucker, organische Säuren, sekundäre Pflanzenstoffe und Ionen gebunden. In Protoplasten mit Zentralvakuole besteht ein enger Zusammenhang zwischen der osmotischen Wasserbindung im Zellsafttraum und der Wasserverfügbarkeit im Protoplasma. Der potentielle osmotische Druck des Zellsaftes kann daher Indiz für den Wasserzustand im Zellinneren und damit des Protoplasmas angesehen werden.

3.4.3. Bestimmung des Wassergehaltes im Blattgewebe

Der Wassergehalt sagt aus, wieviel Wasser ein Organismus enthält:

$$\text{Wassergehalt} = \text{Frischmasse} - \text{Trockenmasse}$$

Gravimetrische Methode

Der Wassergehalt eines Pflanzenorgans oder der Gewebe kann auf verschiedene Weise angegeben werden: Als Wassermenge pro Trockengewicht (TG), pro Gesamt- bzw. Frischgewicht (FG) oder pro Sättigungswassergehalt. Am weitesten verbreitet ist es, den prozentualen Anteil des Wassers am Gesamtgewicht des Organs nach

$$\text{Wassergehalt (\%)} = \frac{\text{FG} - \text{TG}}{\text{FG}} * 100$$

zu bestimmen. Solche Definition des Wassergehaltes bezieht sich auf den *aktuellen Wassergehalt* zum Zeitpunkt der Bestimmung. Sie sagt für sich genommen aber wenig aus, da der Zeitpunkt der Bestimmung willkürlich oder zufällig gewählt wurde.

Die konventionelle Bestimmung des Wassergehaltes erfolgt, wie aus der oben gezeigten Formeln ersichtlich, gravimetrisch, als Differenz zwischen Frisch- und Trockengewicht. Zur Ermittlung von letzterem wird die zu untersuchende Probe (ein Blatt) bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Eine schonendere Trocknung, die kleinere organische Moleküle wie Zucker für die weitere Analyse verfügbar hält, kann bei 60 - 70°C bei entsprechend längerer Trockenzeit erfolgen. Die vollständige Trocknung wird während dieser Behandlung über mehrmale Wiegen bis zur Gewichtskonstante kontrolliert.

Bei meistens Fragestellungen wird diese destruktive Methode das Optimum an Zuverlässigkeit und einfacher Handhabung darstellen. Wenn es darum geht, über längere Zeiträume hin wechselnde Wassergehalte jeweils des gleichen Objektes unter nicht-destruktiven Bedingungen zu ermitteln, ist das Verfahren jedoch unbrauchbar.

Zerstörungsfreie und in-situ Methoden

Grundlage von zerstörungs- und berührungsfreien Ermittlungen des pflanzlichen Wassergehaltes sind in der Regel Korrelationen der unterschiedlichen Absorption radioaktiver bzw. elektromagnetischer Strahlung durch Wasserkörper und deren Volumina.

Zur praktischen Anwendung wurden hierzu insbesondere Messungen der β -Strahlung-Absorption, der Absorption von Mikrowellen und die kernmagnetische Resonanzanalyse entwickelt. Des Weiteren können Blattwassergehalte über den elektrischen Widerstand bzw. die Leitfähigkeit der Blätter charakterisiert werden. Und schließlich gewinnen spektrale Methoden der Reflexionsmessungen im Infrarotbereich, wo die wichtigsten Wasser-Absorptionsbanden liegen, zunehmend an Bedeutung.

β -Strahlung-Messungen beruhen auf Einfluß des Wassergehaltes auf die Strahlungsdurchlässigkeit von Pflanzengeweben. Der Kurvenverlauf der Absorption folgt dabei der Exponentialfunktion [Buschbom 1970]. Die für die jeweilige Blattstruktur spezifischen Absorptionskurven müssen empirisch ermittelt werden. Das heißt, daß die Absorptionscharakteristik für den jeweiligen Anwendungsfall zunächst mittels destruktiver Wassergehaltsbestimmungen an Parallelproben geeicht werden muß.

Die Einschränkung, auf jeden Fall zunächst über die gravimetrische Wassergehaltsbestimmung eine empirische Eichkurve für die kontinuierliche, nicht-destruktive Wassergehaltsmessung aufstellen zu müssen, gilt auch für alle weiteren ähnlichen Verfahren. So ist die Absorption von elektromagnetischen Wellen im Gigahertzbereich durch unterschiedlich dicke Wasserschichten, die in ähnlicher Weise Bestimmung von Blattwassergehalten herangezogen werden kann, vor der Anwendung spezifisch auf jeweiligen Blattp zu eichen [Schulze 1984].

Die Absorption der Mikrowellen folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz der Strahlungsabsorption. Da in Mikrowellenbereich die Absorptionskoeffizienten des Wassers sehr groß sind, ist das Verfahren nur bei Eindringtiefen einsetzbar, die der Dicke von dünnsten Blättern entsprechen [Kreeb 1986, Harbinson 1987]. Kernspinnenresonanz-(NMR)-Messungen haben sich auch in jüngerer Zeit bei der Wasser-

mengebestimmung etabliert. Mit geeigneter technischer Anordnung und Computeraufbearbeitung werden aus den erhaltenen Resonanzspektren Informationen über den Gesamtwassergehalt eines Gewebes erhalten, u. U. sogar über die Aufteilung dieses Wassergehaltes auf unterschiedliche Fraktionen (hinsichtlich des Aggregatzustandes). Wird statt eines einheitlichen Magnetfeldes ein Magnetfeldgradient verwendet, können die NMR-Signale die Wasserverteilung in der Probe mit räumlichen Auflösung anzeigen (NMR-imaging) [Loughman 1984; Ratcliffe 1994].

Eine Größe, die direkt mit dem Wassergehalt zusammenhängt, ist die Wärmekapazität pro Blattfläche. Gewebeteile mit mehr Lufträumen können Temperaturänderungen schneller folgen als solche mit hohem Wasseranteil. Auf diesem Wege läßt eine Messung der Wärmekapazität Rückschlüsse auf den Wassergehalt des Blattes zu [Dauwe 1997].

Auch Messungen der Veränderungen der Dielektrizitätskonstante in Abhängigkeit vom Blattwassergehalt oder der hydrationsabhängigen elektrischen Leitfähigkeit pflanzlicher Gewebe werden gelegentlich genutzt. [Slavik 1974]. Bei dieser Methode wird die Meßeinrichtung das Pflanzengewebe zwar berührt aber nicht zerstört.

Bisher nicht so sehr für Wassergehaltsmessungen auf dem Integrationsniveau des Blattes oder der Einzelpflanze, sondern zur Erfassung von Wassergehaltsänderungen in Pflanzenbeständen werden in zunehmenden Maße IR-Reflexionscharakteristika der Vegetation bei Fernerkundung (remote sensing) herangezogen (Kapitel 2.3.3). Die Sensoren sind hierfür von Flugzeugen, vor allem aber von Satelliten getragen. Geeignete Wellenlängenbereiche liegen bei den Absorptionsbanden des Wassers im NIR-Bereich. Vielfach sind auch die Quotienten der Reflexionswerte bei NIR-Bereich und bei Referenzwellenlängen in nicht-absorbierenden Bereich des Spektrums aussagekräftig [Scholten 2002, Tucher 1980].

3.4.4. Energetischer Zustand des Pflanzenwassers

Für die biochemische Aktivität von Pflanzenzellen ist nicht nur die vorhandene Wassermenge, sondern der thermodynamische Zustand des Wassers wichtig. In Pflanzenphysiologie wird immer der Begriff *Wasserzustand* verwendet. Zwar wurde es nie genau erläutert oder klar definiert, er diene aber immer dazu, die "momentanen Folgen" der Wasserbilanz zu beschreiben [Larcher 1994].

Ist die Wasserbilanz *negativ*, so ergibt sich für die Pflanze ein Nettowasserverlust. Dies bedeutet zwangsläufig, daß die Pflanze zunehmend weniger Wasser enthält. Damit steht ihr für Wachstum, Stoffwechselfvorgänge usw. weniger Wasser zu Verfügung und sie gerät immer mehr in ein Wasserdefizit. Eine Wasserflußrate erlaubt keine Aussage darüber, wieviel Wasser die Pflanze in irgendeinem Moment enthält, wieviel davon effektiv nutzbar ist oder für die Aufrechterhaltung von Lebensvorgängen verfügbar sein muß. Genau dies möchte man mit dem Wasserzustand erfassen.

Wasserzustand ist ein unscharfer Begriff, und aus dieser Unschärfe ergeben sich viele grundsätzliche Fragen. Was bedeutet es beispielsweise, wenn man sagt, Wasser sei für eine Pflanze nutzbar? Wie kann man eine mögliche Aussage quantifizieren? Basiert diese noch zu definierende Wasserzustandsgröße auf objektiven, physikalisch-chemisch einwandfreien Grundsätzen? Lassen sich einfache Meßmethoden dafür finden, und können damit erhaltene Daten in einen logischen Zusammenhang mit physiologischen Parametern wie Enzymaktivität und Photosyntheseleistung oder Wachstum gebracht werden?

Wenn ein Begriff nicht klar definiert wird, ist es sehr schwer, eindeutige Größen zu seiner quantitativen Beschreibung festzulegen. So ist es nicht verwunderlich, daß viele unterschiedliche Ansätze zur Lösung dieses Problems entwickelt wurden.

Grundsätzlich bietet moderne Pflanzenphysiologie *zwei unterschiedliche Konzepte* an [Willert 1995]:

1. Der Wasserzustand einer Pflanze, eines Pflanzenorgans, eines Gewebes oder einer Zelle kann mit rein *gravimetrischen* Methoden beispielsweise als Wassermasse oder Wasservolumen gemessen werden. Man bestimmt so den *absoluten* oder *relativen Wassergehalt*. Hieraus kann man eine Reihe weiterer Größen ableiten.

2. Der zweite Lösungsweg ist die *energetische* Methode für die Bestimmung des Wasserzustandes. In der Pflanzenphysiologie verwendet man als Maß für den energetischen Zustand des Wassers in einer Lösung das *Wasserpotential*, den man mit dem chemischen Potential reinen Wassers (freie Enthalpie) verglichen werden kann [Larcher 1994]. In den Lösungen ist Wasser osmotisch gebunden, es muß Energie zugeführt werden, um dieses Wasser verfügbar zu machen. Das relative Wasserpotential ist die Arbeit, die benötigt wird, um gebundenes Wasser einer wäßrigen Lösung auf das Potentialniveau reinen Wassers zu heben. Das Wasserpotential gibt den Betrag an, um den ein Mol Wasser in der Lösung enthalpieärmer ist, als reines Wasser.

Definition des energetischen Wasserzustandes

Unserer Meinung nach, man soll die Beschreibung des *energetischen Zustandes von Wassermolekülen* auf die Verhältnisse im pflanzlichen System zu übertragen. Ein *energetischer Wasserzustand* (EWZ) könnte man als eine *Elektronen-Schwingungsenergie* oder ein *Elektronen-Vibration-Zustand* von *ganzer Menge der Wassermolekülen* bezeichnen. Eine Wassermolekülen-Menge bedeutet hier das *einheitliche System der Wasserstoffbindungen des Wassers*, das eine Pflanze, ein Pflanzenorgan, ein Gewebe oder eine Zelle enthält. Wie bekannt geben die optische VIS und IR Spektren eine Elektronen-Schwingungsenergie des Objektes an. Also könnte EWZ mittels optischen Spektroskopie untersucht und nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Wasserzustände in Pflanzenblättern zum erstenmal mittels der Spektralanalyse entdeckt. Mit Hilfe der bildgebenden Spektroskopie wurde räumliche Verteilung der verschiedenen EWZ zum erstenmal visualisiert und analysiert.

Energetischer Wasserzustand (EWZ) = Elektronen-Schwingung-Zustand vom Wasser

3.4.5. Spektroskopie der Pflanzenblätter im NIR Bereich

Ein Pflanzenblatt besteht zum überwiegenden Teil aus Wasser. Die Absorptionseigenschaften des Wassers sind daher für die Wechselwirkungsprozesse des Lichtes und Blattgewebe von entscheidender Bedeutung.

Die typischen Bestandteile der Pflanzenblätter, Chlorophylle, haben alle ihre Elektronen-Absorptionsbanden im VIS Bereich (Kapitel 3.3.3) und alle ihre Fundamentalschwingungen im MIR- und FIR-Bereich. Auch Kombinationsschwingungen des Chlorophylls werden nicht im nahen IR beobachtet. Im Nahinfrarotbereich wird Spektrum hauptsächlich durch Vibrationsbanden des Wassers bestimmt. Im dazwischen liegenden Bereich von etwa 700 bis 1300 nm existiert eine Lücke im Absorptionsspektrum der Pflanzen, welche den hohen Reflexionsgrad im nahen Infrarot erklärt, obwohl auch in diesem Bereich sehr schwache Wasserabsorptionsbanden liegen. Die durchschnittliche

Dicke des Blattes von ca. 300 μm läßt die Absorptionsbanden bis 2 μm registrieren. Die Intensität der Absorptionsbanden von MIR Bereich ist gesättigt. Das Reflexionsspektrum von einem Blatt bei der Austrocknung ist in Abb.3.4.1. dargestellt [Rast 1999]. Mit dem Austrocknen des Blattes verschwinden die Wasserbanden aus Absorptionsspektren, dagegen werden die Chlorophyllbanden in ausgetrocknetem Blatt immer noch registriert. Wie aus Abb.3.4.1. ersichtlich ist, ist Valenzband von Wasserabsorption bei ca. 3 μm in frischen Blättern gesättigt und die Kombinations- und Obertöne von den Valenz- und Deformationsmoden lassen sich in der NIR-Spektren des Blattes erkennen. In Pflanzengewebe kann die exakte Position und Ausprägung dieser Übergänge Informationen darüber liefern, wie das Wasser mit den anorganischen und organischen Komponenten angeordnet ist.

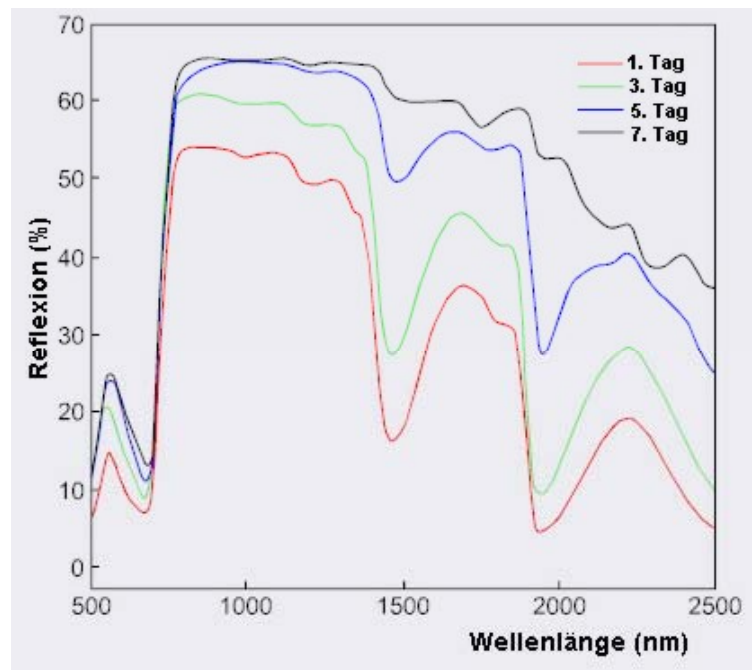


Abb.3.4.1: Veränderung der Reflexion eines Baumwollblattes durch Lufttrocknung (7 Tage) [Rast 1999].

Kapitel 4

Material und Apparatur

4.1. Untersuchungsobjekte

Pflanzenblätter

Die Auswahl von Pflanzenarten deren Blätter für die Untersuchungen herangezogen wurden geschah aufgrund ihrer Unterschiede in der Struktur des Blattgewebes und im Wassergehalt. Damit wurden für die Spektralmessungen die folgenden Pflanzenblättern verwendet:

- *Mesophyte* Blätter: Tabak (*Nicotina tabacum*) und Rizinus (*Ricinus communis*);
- *Sukkulente* Blätter: Kalanchoe (*Bryophyllum* und *Blossfeldiana*), Aloe und Kakteen.

Für spezielle Frage wurden z.T. noch einige andere Pflanzenblätter untersucht:
Gingo (*Ginkgo biloba*), Mammutbaum (*Sequoia gigantea*).

Mesophyte

Die meisten Untersuchungen wurden an Mesophyten - Pflanzenblättern von Tabak (*Nicotina tabacum* L) und Rizinus (*Ricinus communis*) (Abb.4.1.1) durchgeführt. Die Morphologie, Physiologie und Molekularbiologie von Tabak ist seit langem Gegenstand vieler Studien [Hannam 1968, Scheible 1977]. Rizinus wurde auch intensiv untersucht [Schurr 1990].



Abb.4.1.1: Versuchspflanzen von Tabak (a) und Rizinus (b) im Gewächshaus.

Die Messungen wurden überwiegend an Pflanzen durchgeführt, die im Gewächshaus kultiviert wurden. Für einige Experimente wurden die Blätter von Feldpflanzen verwendet, und solche Blätter werden im weiteren als *Feldblätter* bezeichnet. Im Freiland entwickeln die Pflanzen wesentlich größere Blätter als unter Laborbedingungen, die Rizinusblätter wurden dabei rötlich gefärbt (Abb.4.1.2).

Die Pflanzen wurden hinsichtlich des Entwicklungszustandes ihrer Blätter in drei Populationen gruppiert: "*junge Blätter*", "*reife Blätter*" und "*alte Blätter*". Die zeitliche Entwicklungsdifferenz zwischen jungen und alten Blättern betrug etwa zwei Monate. Die jungen Blätter waren 1 bis 2 Wochen alt.



Abb.4.1.2: Versuchspflanzen von Tabak (a) und Rizinus (b) im Freiland.

Sukkulente

Besonders geeignete Objekte für die Messung des Wassergehaltes sind sukkulente Pflanzen (Abb.4.1.3). Unter Sukkulenz versteht man eine aktive Speicherung großer Wassermenge in Pflanzengeweben. Um dies zu gewährleisten, müssen Pflanzen ihre Zellen und Gewebe vergrößern. Mit anderen Worten sie haben dicke, fleischige Sprosse und Blätter, in denen Anzahl und Größe der Parenchymzellen erhöht sind.

Blattsukkulente

Sukkulente Pflanzen - *Kalanchoe Bryophyllum* und *Kalanchoe Blossfeldiana* - dienen hauptsächlich den Untersuchungen von Wasser (Abb.4.1.3). Sukkulente Pflanzen haben fleischige Blätter, so daß sie große Mengen Wasser in ihren Vakuolen speichern können. Das Wasserspeichergewebe hat wenig Chloroplasten.



Abb.4.1.3: Sukkulente Versuchspflanzen von *Kalanchoe Bryophyllum* (a) und *Kalanchoe Blossfeldiana* (b).

Stammsukkulente

Bei der Stammsukkulente fungiert der gesamte Achsenkörper als Wasserspeicher und weist daher einen meist erheblichen Umfang auf. Typisch für die Stammsukkulente ist auch das Fehlen der Laubblätter oder sie sind stark reduziert. Typische Beispiele der Stammsukkulente sind Kakteen. Für die spektralen Untersuchungen des Wassergehaltes wurden in dieser Arbeit auch die Kakteen verwendet.

Wasserinfiltration des Blattes

Hierfür wurde zunächst das Frischgewicht eines soeben von der Pflanze abgetrennten Blattes oder Blatteils bestimmt.

Danach wurde das Blatt in eine mit Wasser gefüllte Kunststoffspritze eingeführt und durch manuelles Anlegen eines Unterdruckes Vakuuminfiltriert. Nach drei- bzw. fünfmaligem sukzessivem Entspannen und Anlegen des Vakuums war der Interzellularraum des Blattes vollständig mit Wasser gefüllt, was optisch dadurch kontrolliert werden konnte, daß das Blatt nahezu durchsichtig erschien (Abb.4.1.4). Üblicherweise werden Lichtstrahlen im Blatt an den Grenzen zwischen Interzellularraum und Zellverband wegen der unterschiedlichen optischen Dichte dieser Gewebe gebrochen. Ist der Interzellularraum mit Wasser gefüllt, so erscheint das Blatt dagegen viel durchsichtiger.

Nach dieser Prozedur wurde das Blatt aus der Spritze entnommen, vorsichtig ohne großen Druck trockengetupft und nochmals gewogen. Die Differenz zwischen beiden Messungen resultiert aus infiltriertem Wasser



Abb.4.1.4: Wasserinfiltration eines Tabak Blattes: Die mit Wasser infiltrierte Blatthälfte (unten) ist durchsichtiger als die nichtinfiltrierte Blatthälfte (oben).

Herstellung der Lösungen von Photosynthesepigmenten

Ethanolische Extraktion

Die kleinen Scheiben wurden mit dem Korkbohrer von Pflanzenblättern abgeschnitten. Das ca. 5 g Blattmaterial wurde in ein 1,5-ml-Safelock-E-Cup (Kunststoff -Küvette) überführt, das sich im 80°C-Heizblock befand und mit 800µl 80% EtO gefüllt war. Mit geschlossenem Deckel wurde es für 20 min extrahiert. Danach wurde der auf Luft abgekühlte Überstand in ein anderes 1,5 ml E-Cup überführt. Die vereinigten Teilextrakte wurden in einer Tischzentrifuge für 30 s bei 14 000 U/min zentrifugiert und der klare, tiefgrüne Überstand, der alle Pigmente enthält, wurde wieder in ein entsprechend nummeriertes 1,5 ml E-Cup überführt. Der Extrakt von Photosynthesepigmenten konnte ebenfalls in dem mit Alufolie umwickeltem 1,5 ml E-Cup bei 0°C gelagert werden.

Ausgepreßter Rohblattsaft

5 g Blätter wurden kleingeschnitten und das Rohhomogenat wurde zunächst durch zwei Lagen gepreßt und anschließend durch vier Lagen des Verbandmulls mit einer zwischenliegenden Lage der Baumwolle filtriert. Das Filtrat des Blattsaftes wurde in ein komplett mit Alufolie umwickeltes 10 ml Reagenzglas überführt und ebenfalls bei 0°C gelagert.

4.2. Meßgeräte

Spektrale Messungen

Die Transmissions- und Absorptionsspektren wurden mit einem HP 8453 Spektrometer, einem UV-Vis-NIR-Photospektrometer Scan 500 aufgenommen. Daneben wurde ein weiteres Miniaturspektrometer OceanOptics USB2000 für Einzelmessungen eingesetzt.

HP 8453 Spektrometer

Für Kontrollmessungen wurde ein HP 8453 Spektrometer (190-1100 nm) verwendet. Das HP 8453 Spektrometer ist ein Einfach-Strahl-Spektrometer und weist dadurch eine hohe Empfindlichkeit auf. Um eine Probe (Pigmentextrakt, Wasser; Pflanzenblatt) zu messen, wird zuerst ein Referenzspektrum I_0 aufgenommen und gespeichert. Als zweiter Schritt wird das Spektrum der Probe aufgenommen und intern das Transmissions- oder Absorptionsspektrum berechnet.

UV-Vis-NIR-Photospektrometer Scan 500

Das UV-VIS-NIR-Spektrometer Scan 500 (Varian, USA) ist ein Zweistrahlenspektrometer für hoch empfindliche Spektralmessungen in einem breiten Bereich von 190 nm bis 3300 nm. Dieses Forschungsgerät ist besonders zur Analyse biologischer, stark absorbierender und streuender Proben geeignet. Damit wurden die Spektren von Pflanzenblättern und Wasserproben mit einer hohen Auflösung im VIS-NIR Spektrumbereich gemessen.

Bei den verwendeten Küvetten handelt es sich um Quarz-Küvetten, die eine Wellenlängendurlängigkeit von 220-3000 nm besitzen. Diese Küvetten sind in verschiedenen Dicken vorhanden, so daß die Weglänge des Lichtes durch die Probe einfach variiert werden kann.

FiberOptic Miniaturspektrometer S2000

Für lokale Spektralmessungen an Blättern wurde das Miniaturspektrometer S2000 (Ocean Optics B.V, Duiven, Netherlands) eingesetzt (Abb.4.2.1). Dies ist ein kompaktes Spektrometer, das besonders für lokale Messungen am Blattgewebe und an Blattadern geeignet ist. Sein Spektralbereich von 190 bis 1000 nm ist für die Untersuchungen der Chlorophyllspektren im Blatt geeignet.

Abb.4.2.1: OceanOptics Miniaturspektrometer S2000.



Beleuchtungsquelle

Für die Aufnahme der Spektralbilder und zur Spektralmessungen eines Blattes wird eine starke Beleuchtungsquelle benötigt, um eine ausreichende Spektralsignatur vom Pflanzenblatt im Transmission- und Reflexlicht zu erhalten. Dafür wurden die folgenden Lichtquellen verwendet:

Xenon-Lampen:

- CXE 300S (Leistung 300 W, Spektralbereich 200 - 800 nm; Cermax);
- LPS-220 B (Leistung 150 W, Spektralbereich 200 - 800 nm; Photon Technology International);

Halogen-Lampen:

- Endolux (Leistung 50 W, Spektralbereich 200 - 800 nm; Classe&Co GmbH);
- Halogenglühlampe (Leistung 75 W, Spektralbereich 200 - 3000 nm; OSRAM);
- Halogenlicht der Ullbricht Kugel (Labsphere, USA) als homogene Lichtquelle.

Die Funktion der Ullbricht Kugel besteht in der räumlichen Integration des Strahlungsflusses. Die benutzte Ullbricht Kugel hat folgende Parameter: Strahlungsfluss der 4 Halogenlampen 120 Watt; mittlere Reflektanz von Bariumsulfat 0.97; Durchmesser der Ullbricht Kugel 305 mm; Durchmesser der Ausgangsöffnung 101.6 mm.

Kalibrierungsquelle HG-1

Für die Wellenlänge-eichung des CCD-Prismenspektrometers wurde eine HG-1 Kalibrierungsquelle (Ocean Optics B.V, Duiven, Netherlands) verwendet. Die kompakte HG-1 Quecksilber-Argon-Lampe (Ocean Optics Company) ist eine spektrale Wellenlänge-Kalibrierungsquelle für UV-VIS-NIR spektrophotometrische Systeme. Sie erzeugt Quecksilber- und Argon-Linien im Bereich von 253 bis 922 nm.

CCD-Kameras

Die Bilder wurden mit einer Kamera aufgenommen. Es handelt sich dabei um schwarzweiß CCD-Kameras, deren Signale über einen Framegrabber im Computer weiterverarbeitet werden können. Zentrales Bauteil einer CCD (charge-coupled device)-Kamera ist ein rechteckiger Chip der das einfallende Licht in einer Pixelmatrix aufnimmt.

Folgende CCD-Kameras wurden zur Erzeugung der optimalen spektralen Aufnahmen benutzt:

- Sony CCD-Kamera XC75 - (Japan);
- SensyCamera - (PCO, Kelheim);
- PixelFly Kamera - (PCO, Kelheim, Deutschland);
- Alpha NIR Kamera - (LOT-Oriel GmbH, Darmstadt).

Nach Überprüfung der aufgelisteten CCD-Kameras wurden folgende Kameras für optisch-spektrale Messungen am Pflanzenblatt eingesetzt:

- im VIS Bereich:
 - PixelFly Kamera (PCO, Kelheim, Deutschland).
- im NIR Bereich:
 - Alpha NIR Kamera - (LOT-Oriel GmbH, Darmstadt, Deutschland);

PixelFly Kamera (PCO, Kelheim, Deutschland)

Für Spektralaufnahmen wurden zwei Arten der PixelFly Kamera erfolgreich eingesetzt: PixelFly VGA und PixelFly Scientific. Die Kameras sind im Spektralbereich 300-1050 nm, mit der 12 Bit Dynamik und einem hochauflösenden CCD-Sensor mit 640 x 480 und 1280x1024 Pixel besonders gut für die Blattaufnahme geeignet. Weitere Parameter sind: Belichtung von 1µsek bis 10 sek; 8 Vollbilder pro Sekunde; Minimales Rauschen.





Alpha NIR Kamera (LOT, Darmstadt, Deutschland)

Die AlphaNIR Indigo-System Kamera ist eine kompakte, digital Kamera für das Nahinfrarot im Wellenlängenbereich 0,9-1,7 μm . AlphaNIR Kamera mit dem InGaAs Detektor von 320x256 Pixeln und der Belichtungszeit 1 μsek -33 msek sowie mit der 12 bit Auflösung ist ein sehr geeignetes Werkzeug für die Spektralaufnahme im NIR Bereich. Software erlaubt dabei Sequenzaufnahmen und -darstellungen sowie Auswertung von Intensitätsparametern bezogen auf Punkten, Linien und Bereichen.

Bandpaßfilter

Als dispersive Elemente des 32-Kanäle bildgebenden CCD-Spektrometers wurden die schmalbandigen Lichtfilter verwendet, die Strahlung in einem engen Wellenlängenband von wenigen nm transmittieren und die Strahlung außerhalb dieses Bereiches unterdrücken sollten. Diese Forderung wird von Interferenz-Bandpaßfiltern (Coherent GmbH, Dieburg) (Abb.4.2.2) erfüllt. Diese Filter bestehen aus mehreren, durchsichtigen Schichten mit unterschiedlichem Brechungsindex. Die Dicke der Schichten beträgt ein Viertel der maximal transmittierten Wellenlänge. Die optischen Eigenschaften von Bandpaßfiltern lassen sich mit Hilfe einiger Parameter beschreiben: Der Transmissionsgrad bei der maximal transmittierenden Wellenlänge liegt bei handelsüblichen Interferenzfiltern bei 50-80 %. Die Halbwertsbreite liegt typischer Weise bei 10-20 nm.

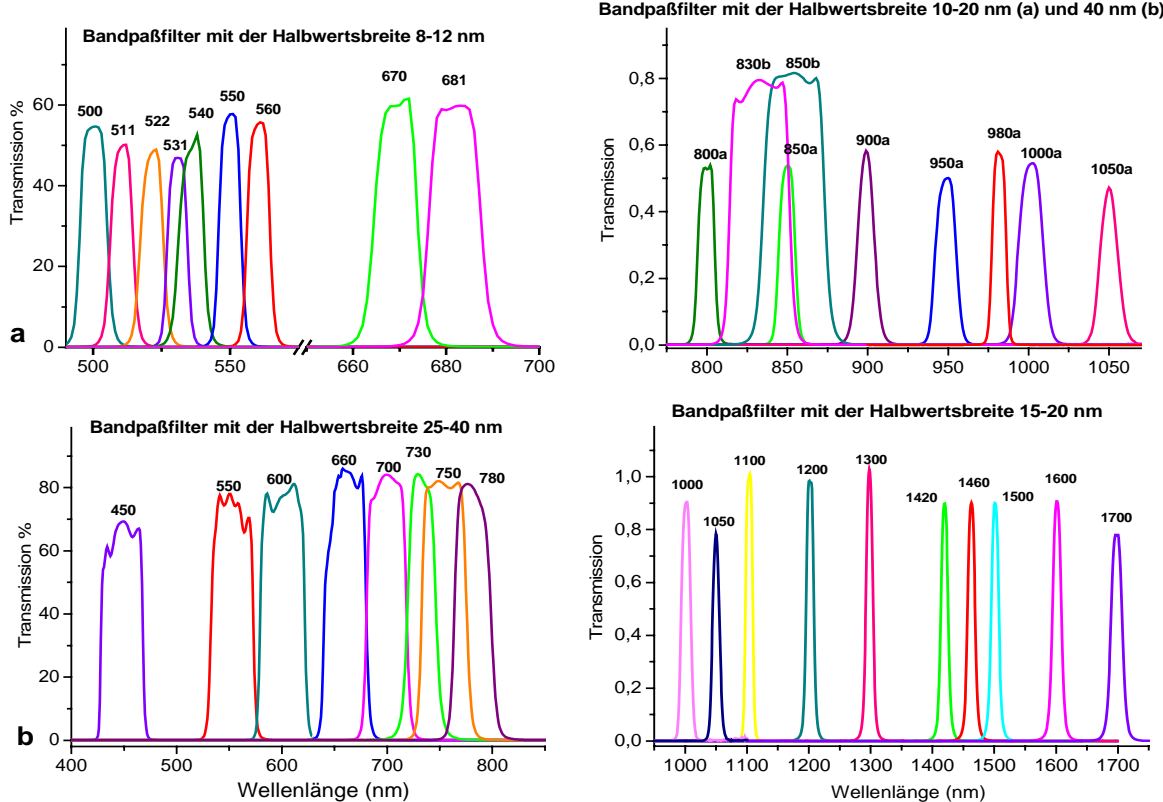


Abb.4.2.2: Transmissionsbanden von verwendeten Interferenz-Bandpaßfiltern.

ERGEBNISSE

Kapitel 5

Entwickelte Methoden

5.1. Methode der bildgebenden Spektroskopie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Verfahren der bildgebenden Spektroskopie für die spektral-digitale Visualisierung und Analyse der räumlichen Verteilung von Inhaltstoffen am Pflanzenblatt. Für die Erfüllung dieses Ziels wurden zwei Verfahren der bildgebenden und orts aufgelösten Spektroskopie und zwei Funktionsmodelle der bildgebenden Spektrometer entwickelt:

- ein bildgebendes multispektrales CCD-Spektrometer mit der Anwendung von CCD-Kameras und mehreren Bandpaßfiltern,
- ein abbildendes dispersives 2D CCD-Spektrometer auf der Basis eines Prismen-Monochromators und einer CCD-Kamera.

Die Spektrometer werden auf eine Drehplatte montiert, das heißt die beide funktionieren als Imaging Goniometer-Spektrograph. Die entsprechende Bildverarbeitungsmethoden zur Ermittlung und Analyse von Spektralbildern wurden ebenfalls entwickelt. Die aufgebaute Spektrometer und entwickelte spektrale Bildverarbeitung-Verfahren sind innovativ und einzigartig. Um den Aufbau und das Funktionsprinzip der beiden bildgebenden spektroskopischen Methoden und der abbildenden Spektrometern zu erklären, werden im folgenden die allgemeinen Hauptprinzipien der Spektrometertechnik kurz aufgezählt.

5.1.1. Allgemeine Grundlagen der Spektrometertechnik

Spektrale Auflösung

Fähigkeit eines optischen Systems, innerhalb des elektromagnetischen Spektrums differenziert zu messen.

Spektrometer

Meßgerät zur differenzierten Erfassung von elektromagnetischer Strahlung.

Spektrometertechniken

Für spektralen Messungen kommen verschiedene Spektrometertypen zum Einsatz. Um ein Spektrum aufnehmen zu können, muß man das Licht in seine spektralen Bestandteile zerlegen. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten, dabei unterscheidet man zwischen den dispersiven und nichtdispersiven Techniken.

Dispersive Spektrometer

Dispersive Geräte nutzen die Brechkraft von Prismen oder die Beugung an Gittern. Diese Gerätetypen wurden in der Vergangenheit fast ausschließlich genutzt und sind auch heute noch in vielen Arten vertreten.

Prismenspektrometer

Prismen brechen Licht verschiedener Wellenlängen unterschiedlich stark. Kurze Wellenlängen werden stärker gebrochen als lange. Mit einer Spaltanordnung wird die

gewünschte Wellenlänge separiert. Die Anordnung des Prismas gemeinsam mit einem Spiegel auf einem Träger ermöglicht die Auswahl der Wellenlänge durch Drehung des Trägers. Als Prismen kommen im VIS-Bereich Quarzglas sowie IR-transparente Materialien, bevorzugt Alkalihalogenide (NaCl, KBr) zum Einsatz. Prismenmonochromatoren sind einfach herzustellen. Deshalb waren Prismengeräte historisch gesehen die ersten "richtigen" Spektrometer.

Gitterspektrometer

Häufiger verbreitet sind die Gitterspektrometer, die ein Beugungsgitter als dispersives Element enthalten. Hierbei wird das aus dem Eintrittspalt kommende Licht durch einen Spiegel parallelisiert. Am Gitter entsteht Interferenz, dadurch wird Licht in seine spektrale Anteile zerlegt. Die Separation der Wellenlänge erfolgt mittels des Austrittsspalts. Durch Drehen des Gitters kann die Wellenlänge der Strahlung, die den Spalt passiert, verändert werden.

Nichtdispersive Spektrometer

In den sogenannte nichtdispersiven Geräten verwendet man keine dispersive Elemente und kein Spalt. Dabei wird gesamte Strahlung von Objekt gleichzeitig erfaßt und es führt zur erhöhte Sensibilität solcher Spektrometer.

Filter-Spektrometer

Die einfachste Variante der Spektralzerlegung bieten nichtdispersive Bandpaßfilter-Geräte. In ihnen werden Filter genutzt, um einzelne Spektralbereiche zu separieren. Zur Selektion werden mehrere Filter der Reihe nach in den Strahlengang gebracht, und so das Spektrum aufgenommen. Solche Geräte sind preiswert, besitzen aber früher eine sehr schlechte spektrale Auflösung. Deshalb wurden sie nur zu wenigen, speziellen Einsatzzwecken genutzt.

Fourier-Spektrometer

Mit der Entwicklung der Computertechnik war es möglich, die Fouriertransformation zu automatisieren und schnell auszuführen. Dadurch entstand die Möglichkeit, Fourier-Spektrometer der breiten Anwendung zugänglich zu machen. Bei diesem Verfahren wird nicht nach Wellenlängen separiert gemessen, sondern es wird mit allen Wellenlängen gleichzeitig ein Interferogramm aufgezeichnet. Durch Anwendung der Fouriertransformation kann daraus das Spektrum berechnet werden.

Bildgebende Spektrometrie

Moderne Bildverarbeitungsmethoden ermöglichen gleichzeitig sowie die räumliche als auch spektrale Auflösung präzise zu erfassen. Bildgebende Spektrometrie ist eine Visualisierung der räumlichen Verteilung der gemessenen Strahlung innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereiches am untersuchten Objekt. Sensor muß in der Lage sein, entweder zeitgleich oder hintereinander verschiedene Orte auf dem Objekt zu messen. Dies ist möglich durch:

- den Einsatz eines CCD-Arrays. Ein CCD-Sensor ist eine Ansammlung von einzelnen Detektoren, die in einem räumlichen Linien- oder Viereckmuster angeordnet sind.
- eine Sscan-Abtastung des Objektes, dabei wird eine Linie von Objekt mit der Schrittbewegung aufgenommen.

Bildgebende Spektrometrie stellt die neue Generation der bildgebenden, ortsauflösenden Spektrographen vor. In Rahmen dieser Arbeit auf diesem Prinzip wurden die zwei bildgebender Spektrometer entwickelt.

5.1.2. Verfahren der bildgebenden Spektroskopie

Eine innovative Methode bildgebender Spektroskopie für die Untersuchung räumlicher und zeitlicher Dynamik der Spektralcharakteristiken von Objekten und ihrer Einzelkomponenten wurde in Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Diese Methode ermöglicht die Herstellung, Bearbeitung und Analyse von Spektralbildern, um die Wechselwirkung des Lichtes mit dem Objekt unter Berücksichtigung der Reflexions- Transmissions- Absorptions- und Streuprozesse zu erforschen.

Im allgemeinen bedeutet bildgebende Spektroskopie:

- Bildaufnahme eines Objektes in mehreren spezifischen bzw. in allen Spektralbereichen;
- Spektral-digitale Bildverarbeitung und -analyse, um Informationen über Spektralcharakteristiken, den Gehalt und Zustand des untersuchten Objektes sowie seiner Komponenten zu erhalten.

Die bisher existierenden Methoden der Image Spektroskopie bestehen hauptsächlich in der Analyse von Reflexionsbildern bzw. -spektren, die bei der Satelliten- oder Flugzeug-Fernerkundung aufgenommen wurden. Das Ziel Spektralfernerkundung ist die Identifizierung von Lands- und Vegetationsobjekten sowie eine Einschätzung ihrer Bestände bzw. ihres allgemeinen Zustandes. Dafür berechnet man vorzugsweise die Reflexions-Indizes oder die *Ratio-Bilder* (Verhältnis der Bilder) von verschiedenen Spektralbereichen (Kapitel 2.3.2).

Die von uns entwickelte Methode ist für die Spektralmessungen sowohl im Transmissions- als auch im Reflexionslicht geeignet. Dabei wird die exakte spektrale Auswertung und Analyse der Spektralcharakteristiken von untersuchten Objekten gewährleistet, weil die registrierte Spektralsignatur durch das Beleuchtungslicht normiert wird. Damit können die Transmissions- und Absorptionsbilder ermittelt werden. Spektralbilder werden im Bereich von mehreren Absorptionsbanden analysiert, das sowohl die Ermittlung der räumlichen Verteilung und präzise quantitative Gehaltsbestimmungen sondern auch die Analyse der energetischen Zustände von gewünschten Substanzen des Objektes ermöglicht.

Eine solche Analyse ist in vorliegender Arbeit für verschiedene Pflanzenblätter durchgeführt. Die Methode ermöglicht, die räumlichen Profile und Zeitdynamik der Chlorophyll- und Wasserverteilung im Pflanzenblatt zu ermitteln und zu analysieren (Kapitel 6 und 7). Mit der dabei entwickelten Densitogramm-Spektral-Analyse (DSA) wurden die Methoden der Bildspektralanalyse ergänzt und erweitert. Damit könnten die Teilmengen einzelner Substanz (Wasser, Chlorophyll in Blättern) spektral extrahiert werden, die die verschiedenen energetischen Zustände beweisen.

Die Methode der bildgebenden Spektroskopie verbindet die Vorteile von modernen Techniken der digitalen Bildverarbeitung und Spektralanalyse. Diese Art der Spektroskopie arbeitet ähnlich der Fourie Spektroskopie, das heißt sie funktioniert ohne Spektralspalte und verwendet den ganzen Strahlungsstrom vom Objekt. Deswegen verfügt Image Spektroskopie über eine starke Signalamplitude und ist damit sehr empfindlich im Vergleich zu kommerziellen Spektrometern. Die verwendeten CCD-Kameras und Bandpaßfilter ermöglichen es, die Bilder der Strahlung verschiedener Spektralbereiche zu registrieren. Die Bandpaßfilter realisieren die Funktion der Spektraldispersion. Mit Hilfe eines Computers werden die Spektralbilder des Objektes graphisch und numerisch bearbeitet und analysiert, um jede einzelne Substanz optisch zu extrahieren.

Spektrale Bildsequenzen sind räumliche Darstellung der Spektralsignatur von zu untersuchendem Objekt und tragen in sich vierdimensionale Information. Zu vier registrierten Koordinaten gehören zwei Raumkoordinaten (x und y) des Digitalbildes, eine spektrale Koordinate (λ) für jeden Bildpunkt und eine Zeitkoordinate (t) (Abb.5.1.1). Auf solche Weise kann mittels der Sequenzen von Spektralbildern das dynamische Verhalten der spektralen Eigenschaften von untersuchten Substanzen in jedem Raumpunkt der Objektfläche analysieren.

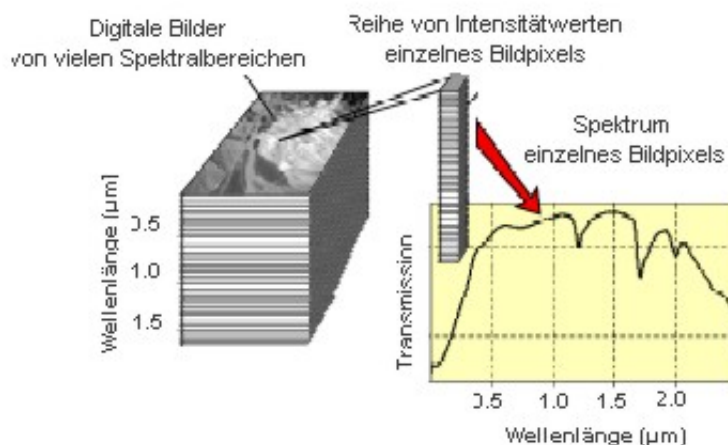


Abb.5.1.1: Prinzipielles Schema der bildgebenden Spektroskopie.

5.1.3. Bildgebendes CCD-Goniometer-Spektrometer

In vorliegender Arbeit wurde ein Modell des bildgebenden CCD-Spektrometers für VIS und NIR Bereiche entwickelt. Der aufgebaute Gerät ist ein hochauflösendes digital-optisches Goniometer-Spektrometer, das in seiner jetzigen Version mit 32 Kanälen die elektromagnetische Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 0,4-1,7 µm erfasst. Die Meßwerte werden elektronisch in 12 bit Bildmatrix gewandelt und auf Computerfestplatte gespeichert. Abbildung 5.1.2 zeigt das Aufbauschema dieses CCD-Spektrometers. Eine mit dem Filtersatz versehene CCD-Kamera weist senkrecht auf das zu untersuchende Objekt (Pflanzenblatt). Mit entsprechenden Filtern werden die spektralen Sequenzen der Grauwert-Bilder aufgenommen. Als Beleuchtung diente das Halogenlicht einer Ulbricht Kugel, mit der die homogene Bildhelligkeit erreicht wird. Die Funktion der Ulbricht Kugel besteht in der räumlichen Integration des Strahlungsflusses.

Der bildgebende Goniometer-CCD-Spektrometer ermöglicht das Studium sowohl des Reflexions- und Absorptionsvermögen als auch Lichtstreuung im Blattgewebe zu studieren. Die Kamera und Bandpaßfilter werden über eine Halterung an einer Profilschiene (OWIS, Staufen) befestigt, die wiederum im Zentrum der Goniometer-Drehplatte montiert ist. Der goniometrische Bau des Gerätes erlaubt die Transmissions- und Reflexionsbilder bei normalem Einfallswinkel des Lichtes und die winkelabhängige Verteilung der Transmissions- und Reflexionsstrahlung schrittweise bei verschiedenen Lichteinfallswinkeln zu registrieren. Damit wurden an Pflanzenblättern die systematischen Studien mit Variationen der Beleuchtungs- und Aufnahmewinkel durchgeführt, die die Informationen über Streuprozesse und damit über die Wechselwirkung des Lichtes mit Blattgeweben lieferten.

Das entwickelte Modell des bildgebenden Spektrometers verfügt über eine größere Sensibilität im Vergleich zu den gewöhnlichen Einkanalspektrometern. Es ist durch die Signalsammlung nach der großen Anzahl von Bildpunkten (CCD-Detektor benützter PixelFly Kamera besteht aus $1024 \times 1280 = 1\,310\,720$ Pixel !) und durch die beste Sammlung des Streulichtes (Anwendung eines fokussierenden Objektivs) bedingt. Zum Beispiel, die mit Hilfe eines industriellen IR-Spektrometers aufgenommene Durchsichtigkeit der Pflanzenblätter ist ca. 1% (Kapitel 6.2 und 7.1). Mit Hilfe unseres bildgebenden Spektrometers wurden Blatt-Transmissionsgrade bis 45 % (in 50 Mal größere Werte) registriert. Gleiche Transmissionswerte für Pflanzenblätter wurden bei der Spektralmessungen mit Anwendung der Funktionsweise der Lichtsammlung mittels der Ulbricht Kugel erreicht [Willert 1995].

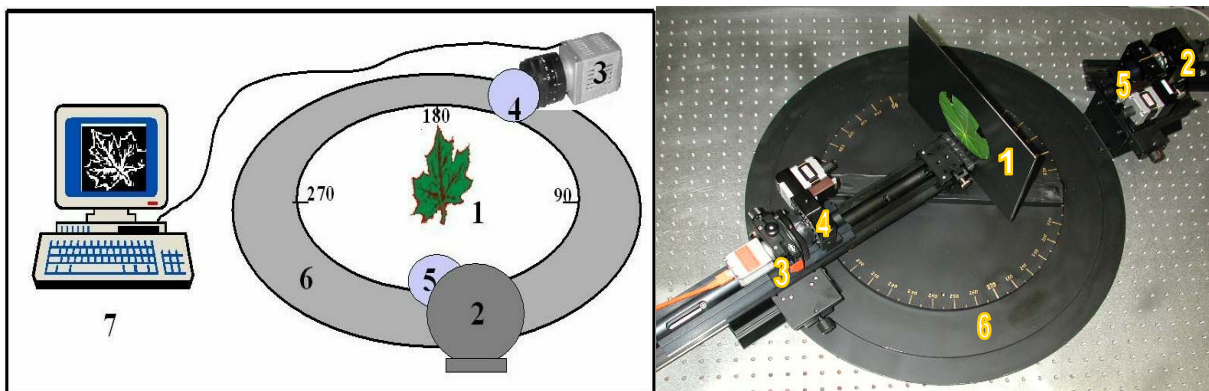


Abb. 5.1.2: Aufbauschema und ein Bild des bildgebenden Goniometer-CCD-Spektrometers:
 1 - Pflanzenblatt; 2 - Lichtquelle (Xenonlampe oder das Halogenlicht von einer Ulbricht Kugel);
 3 - CCD Kamera; 4,5 - Bandpaß- oder Polarisationsfilter; 6 - goniometrische Drehplatte;
 7 - Computer mit der Bildverarbeitung-Software.

Technische Daten des bildgebenden CCD-Spektrometers sind in Tabelle 5.1.1. zusammengefaßt:

Technische Daten	VIS-NIR	NIR
Spektralbereich	400 - 1050 nm	900-1700 nm
Anzahl von Kanälen	16	16
CCD-Kamera	PixelFly	Alpha NIR
Bildgröße in Pixelanzahl	640 x 480 1280 x 1024	318 x 256
A/D Dynamik	12 Bit	12 Bit
Belichtungszeit	10µs - 10 s	500µs und 16ms
Lichtquelle	Halogen- und Xenonlicht	Halogenlicht
Goniometrische Messung	1° Winkelschritt	1° Winkelschritt

Tabelle 5.1.1: Technische Daten des bildgebenden Goniometer-CCD-Spektrometers.

5.1.4. Etappen und technische Durchführung des Verfahrens

Die entwickelten Verfahren und Meßprozedur zur Ermittlung und Bearbeitung der Spektralbilder umfaßte folgende Schritte:

- Vorläufige Spektralmessungen und -analyse eines Objektes (Pflanzenblatt);
- Auswahl der CCD-Kamera und Bandpaßfilter;
- Aufnahme eines Dunkelstrombildes;
- Digitale Spektralaufnahme einer Bildsequenz des Beleuchtungslichtes;
- Fixieren des Pflanzenblattes in der optischen Ebene;
- Digitale Spektralaufnahme der Bildsequenz vom Objekt;
- Abspeichern der Rohdaten;
- Auswertung der Transmissions-, Extinktions- und Absorptionsbilder;
- Digital-Spektrale Bearbeitung der Absorptionsbilder;
- Densitogramm-Spektral-Analyse (DSA) von Bilddaten;
- Grafische Bearbeitung und Interpretation von Spektraldaten.

Um die Möglichkeiten und Vorteile der entwickelten Methode der bildgebenden Spektroskopie zu erklären, werden im folgenden die Etappen der technischen Durchführung und Datenverarbeitung detailliert beschrieben.

Vorläufige Spektralmessungen und -analyse

Um das Objekt mit Hilfe der Image Spektroskopie zu untersuchen, muß man vorläufig die Angaben über seine Spektralcharakteristiken haben. Dafür genügt es meist, die Literaturdaten zu verwenden. Für exakte bildgebenden Spektroskopie wäre es immer besser, eigene ausführliche Spektralmessungen mittels eines beliebigen industriellen Spektrometers durchzuführen. So können die Lage und Verhalten der charakteristischen Absorptionsbanden des untersuchten Objektes möglichst genau bestimmt werden. Für unsere Zwecke wurden Spektralmessungen der Pflanzenblätter mittels der HP 8453 (Spektralbereich 190-1100 nm) und 500 SCAN (190-3300 nm) Spektrometer durchgeführt. Spektrale Auswertung wurde mit der Software "Spectra" und "Origin" gemacht.

Spektralinformation ist für die Klärung der charakteristischen Spektralbereiche sowohl für das ganze Objekt als auch für seine Substanzkomponenten notwendig. Es wurden ausführlich die Transmissions- und Reflexionsspektren von Rizinus, Tabak und sukkulenten Blättern studiert. Die Transmissionsspektren sind für unsere Zwecke wertvoller, weil Reflexionsspektren vorzugsweise nur Information über die Lichtprozesse an Blattoberfläche geben. Hierbei sei daran erinnert, daß ein Pflanzenblatt ein kompliziertes optisches Objekt ist, in dem die MLS- und Absorption-Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Die Transmissionsdaten hingegen tragen die volle Information über die Wechselwirkung-Lichtprozesse, die im Blattgewebe ablaufen.

Die Spektralanalyse der untersuchten Pflanzenblätter wird in Kapitel 6 und 7 ausführlich erläutert. An dieser Stelle soll nur erwähnt werden, daß das Transmissionsspektrum des Blattes die breiten Elektronenbanden (450, 670 nm) von Chlorophyll Pigmenten im VIS Bereich und Schwingungsbanden vom Wasser (835, 970, 1170, 1450, 1930 und 2933 nm) im NIR Bereich enthält .

Auswahl der CCD-Kamera und Bandpaßfilter

Der spektrale Aufnahmebereich kann an die experimentelle Zielsetzung durch die Auswahl verschiedener Kamera und Bandpaßfilter angepaßt werden. Die CCD-Kamera und die Filter wurden entsprechend der charakteristischen Spektralbereichen von studierten Pflanzenblättern ausgewählt. Eine entscheidende Rolle für die Kameraauswahl spielt der Spektralbereich ihrer Detektorsensibilität und für die Filterauswahl - ihr Durchlaßbereich.

CCD-Kameras

Die Bildaufnahme von Pflanzenblättern wurde mit Hilfe einer schwarz-weiß-CCD-Kamera realisiert, die das einfallende Licht in einer Pixelmatrix aufnimmt. Für die Spektralaufnahmen im VIS Bereich 400-1050 nm wurde eine PixelFly Kamera (PCO GmbH; Kelheim) verwendet. Der VGA-Detektor der PixelFly Kamera enthält eine CCD-Matrix mit 640X480 bzw. 1280 x 1024 Pixel. Das Signal setzt sich dabei aus den 4096 Grauwertestufen zusammen. Diese erlaubt einen weiten Intensitätbereich bei konstanter Belichtungszeit detektieren. Wiederum könnte die Belichtungszeit zwischen 10 μ s und 10 s variiert werden. Im NIR Bereich 900-1700 nm wurde eine NIR Alpha Kamera (LOT, Darmstadt) mit der räumlichen Auflösung des InGaAs Detektors von 320 x 256 Bildelementen benutzt. Die Kamera können mit verschiedenen Objektiven und Zwischenringen versehen werden, so daß mit variablen Objektdistanzen und Bildausschnitten gearbeitet werden kann. Die meisten Aufnahmen wurden mit einem 25-mm-Objektiv (Xenoplan 1.9/25 von Schneider / Kreuznach) aufgenommen.

Bandpaßfilter

Für die Aufnahmen der Pflanzenblätter in verschiedenen Spektralbereichen wurde ein Satz aus den 32 Interferenz-Bandpaßfiltern verwendet. Ein Vergleich mit den remote sensing Satelliten-Multi-Spektralsystemen läßt das entwickelte Modell des Spektrometers als ein 32 Kanälen-Multispektrometer bezeichnen. Für die spektrale Analyse der Pflanzenblätter wurden die Bilder in verschiedenen Bereichen intensiver Absorptionsbanden gemessen. Mittels der CCD-Kamera wird die Durchlaßcharakteristik des Blattes aufgenommen Die daraus ermittelten Extinktionswerte bestehen aus der Resonanzabsorption und des MLS-Untergrundes. Deshalb hat die Lage der Durchlaßbande von Filtern bezüglich der Absorptionsbanden des Blattes die wichtige Bedeutung für korrekte spektrale Bildaufnahme. Für eine exakte Spektralanalyse unter Berücksichtigung vom Streulicht müssen Bildaufnahmen im Bereich der Absorptionsmaxima einer ausgewählten Substanz und im Bereich der Absorptionsminima gemacht werden.

Für die quantitative Analyse des Wassergehaltes in Pflanzenblättern wurden die Spektralbilder im Bereich der intensiven $2\nu_{OH}$ Absorptionsbande bei 1450 nm aufgenommen. Dabei wurden innerhalb der untersuchten Wasserabsorptionsbanden bis zu 6 Filter verwendet, was erlaubte, sowohl die Maxima als auch die Form der Banden zu bestimmen. Die Anordnung der Durchlaßbanden von Filtern bezüglich dieser Absorptionsbande ist in Abb.5.1.3b gezeigt. Eine Filterbande 1460 nm liegt fast exakt im Maximum der $2\nu_{OH}$ Wasserbande und die Filterbanden 1300 und 1700 nm an Bandenkanten. In der ersten linearen Annäherung, um den MLS-Untergrund zu berücksichtigen, muß das mittlere Bild der Lichtintensitätsverteilung bei 1300 und 1700 nm berechnet werden und danach von dem Lichtbild bei 1460 nm subtrahiert werden. Das auf solche Weise erhaltene Bild zeigt die Verteilung der Absorptionswerte vom Wasser im Pflanzenblatt. Mit Hilfe einer weiteren Spektralanalyse läßt sich die räumliche Verteilung des Wassergehaltes am Blatt auswerten und sie grafisch bzw. numerisch darstellen. Bei einer strengen Berechnung muß die Verringerung des MLS-Beitrages im Bereich der starken Absorptionsbanden berücksichtigt werden.

Für die Visualisierung der räumlichen Verteilung des Chlorophylls im Blatt werden die Spektralaufnahmen im Bereich des Maximums der roten Absorptionsbande bei 660 nm und an den Bandenkanten bei 550 und 730 nm durchgeführt (Abb.5.1.3). Mittels der oben beschriebenen Bildverarbeitung werden die Absorptionsbilder von der Chlorophyll-Verteilung am Blatt ausgewertet.

Bei der Registrierung des Durchlichtes muß berücksichtigt werden, daß das Licht sowohl von dem Objekt (Blatt) selbst als auch von den Bandpaßfiltern und Kamerachip verändert wird. Die von der CCD-Kamera registrierte Lichtintensität wird sowohl durch die Kamerasensibilität als auch durch die Anordnung der Filterbande zur Absorptionsbanden und durch den Filterdurchlaßgrad bestimmt. Es bedeutet, daß die Effektivität der Filteranwendung durch das Integral der Überdeckung der Filterdurchlaßbande mit der Absorptionsbande der Substanz bestimmt wird. Für eine korrekte Auswertung der Spektralbilder müssen alle genannten Faktoren berücksichtigt werden und Bildspektren radiometrisch kalibriert werden. Um der Notwendigkeit der radiometrischen Bilderkorrelation zu entgehen, wurde eine Normierung der Durchlaßstrahlung auf die Beleuchtungsstrahlung für die Auswertung der Transmissionsbilder in unserem Verfahren durchgeführt.

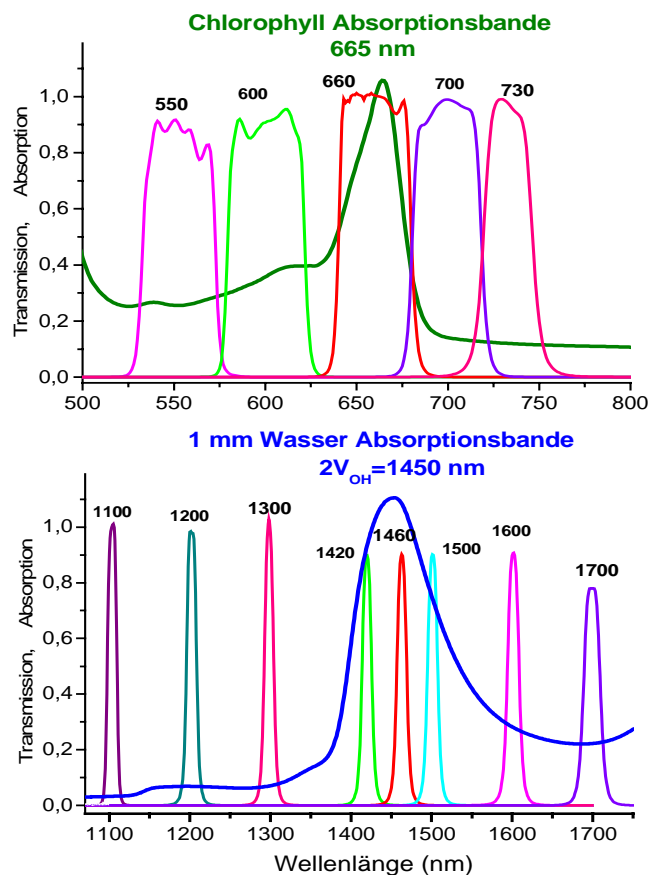


Abb.5.1.3: Anordnung der Durchlaßbanden von Filtern bezüglich der untersuchten Chlorophylls- und Wasser- Absorptionsbanden.

Spektralaufnahmen

Eine Fülle von Faktoren beeinflusst die Strahlung, die von Blättern zur Kamera gelangt. Dabei sind 3 Strahlungssteile zu unterscheiden: durchgelassenes, gestreutes und fluoreszierendes Licht. Die gesuchten Informationen sind als charakteristische Signatur in der von Kamera empfangenen Strahlung erhalten. Da die gesuchte Signatur aber in Bilddaten meist versteckt und verrauscht vorliegt, muß durch eine Variation und Kombination vorgehender Parameter sichergestellt werden, daß möglichst eindeutige Information in der experimentellen Anordnung gemessen wurde. Bei der Registrierung des Durchlichtes vom Pflanzenblatt $I(\lambda_n)$ muß berücksichtigt werden, daß das Licht sowohl von dem Objekt (Blatt) selbst als auch von den Bandpaßfiltern und Kamerachip verändert wird. Für nachfolgenden Spektralanalyse und -bearbeitung der Spektralbilder mußte sowohl die vom Objekt veränderte Strahlung als auch das Beleuchtungsspektrum gemessen werden.

Spektralaufnahme des Beleuchtungslichtes - $I_0(\lambda_n)$

Die spektroskopische Bildaufnahmen wurden in der Kombination mit den spektralen Charakteristiken des Beleuchtungslichtes gemacht. Die Spektralbilder $I_0(\lambda_n)$ sind als Referenzsignal für die Ermittlung der Transmissions- und Extinktionsbilder notwendig. Als Beleuchtungsquelle kommen Halogen- und Xenon-Lampen und LED-Beleuchtungsfelder unterschiedlicher Wellenlänge zum Einsatz. Die besten Ergebnisse wurden im Halogenlicht erzielt. Um eine homogene Beleuchtung des Blattes zu erreichen, wurde die Ulbricht Kugel benutzt. Durch die Beleuchtung mit dem Halogenlicht von der Ulbricht Kugel konnte die Bildhelligkeit optimiert und homogen eingerichtet werden (Abb.5.1.4.). Die Beleuchtungs-homogenität ist für die korrekte Bestimmung der Absorption und für die Ausschließung des Einflusses der ungleichmäßigen Beleuchtung auf die optisch-spektralen Charakteristiken der studierten Substanzen wichtig. Die Lichthomogenität hilft die Effekte des Quer-Strahlungstransports im Blattgewebe zu vermeiden, was auch speziell untersucht wurde.

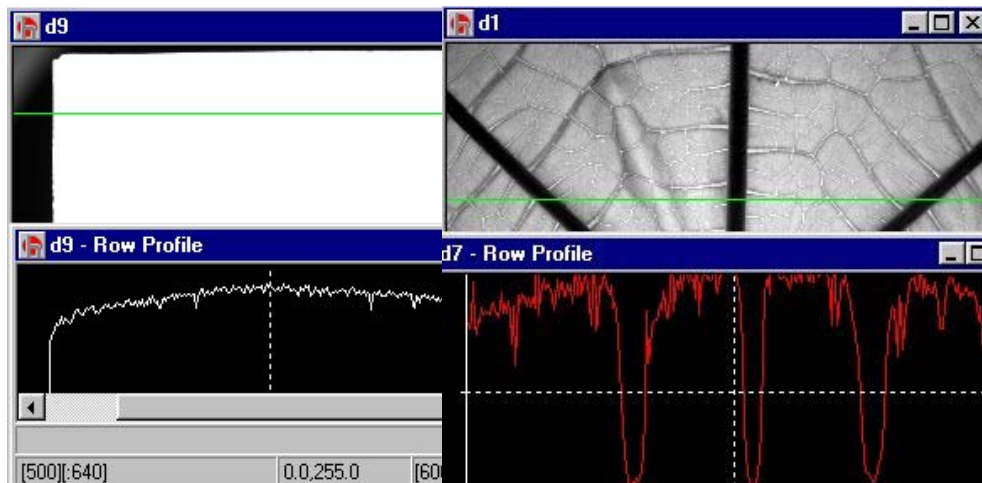


Abb.5.1.4: Spektralaufnahme des homogenen Halogen-Beleuchtungsfeldes $I_0(\lambda_n)$ (links) und Transmissionsbildes vom Rizinus Blatt $I(\lambda_n)$ (rechts) und ihre Grauwert-Zeilenprofile.

Wählt man eine Lampe (Halogen), bei der $I_0(\lambda_n)$ bekannt ist, so ergibt sich nach der Ulbricht Kugel eine homogene spektrale Strahldichte an der Öffnung. Mit dieser Einstrahlung werden die Grauwerte des Bildes gemessen. Zur Messung des Beleuchtungsfeldes $I_0(\lambda_n)$ wurden dieselben Bandpaßfilter eingesetzt, die auch bei den Blattaufnahmen verwendet wurden. Die Beleuchtungsaufnahmen wurden in denselben spektralen Punkten durchgeführt, die auch bei der Blattaufnahmen genutzt werden (Abb.5.1.3).

Die Spektralaufnahme des Blattes - $I(\lambda_n)$

Fixieren der Blätter in der optischen Ebene

Die Fixierung des Blattes ist notwendig, da eine Bewegung des Blattes bei der Spektralmessung als Falschsignal interpretiert werden würde. Zu Artefakten führen auch lokale Änderungen des Winkels zwischen der Oberfläche eines Blattbereichs und der optischen Achse, die etwa durch Verkrümmungen des Blattes hervorgerufen werden können. Das Blatt wird an einem schwarzen Metallrahmen mit kleinem Klebstreifen befestigt. Der Stiel wird mittels des Parafilms und Schaumstoffes in einem mit Wasser gefüllten 2-ml-Safelock-Ependorf-Cup (Kunststoff-Küvette) fixiert, das wiederum an einer Profilschne im Zentrum der Goniometer-Drehplatte befestigt wird. Die CCD-Kamera und Filter werden ebenfalls an dieser Profilschne montiert, womit die Bewegungsstörungen unterdrückt wurden.

Aufnahme einer Bildsequenz

Nach erfolgter Positionierung des Blattes und Kamerasystems wird der Bildverarbeitungs-Interpreter ‚Heurisko‘ (Aelon, Hanau) gestartet. Durch Aufruf des Workspaces (Unterprogramm) "Bildaufnahme" erhält man eine Livebildanzeige auf dem Monitor des Rechners, mit deren Hilfe das Bild in Schärfe und Helligkeit optimiert wird (Abb.5.1.5).

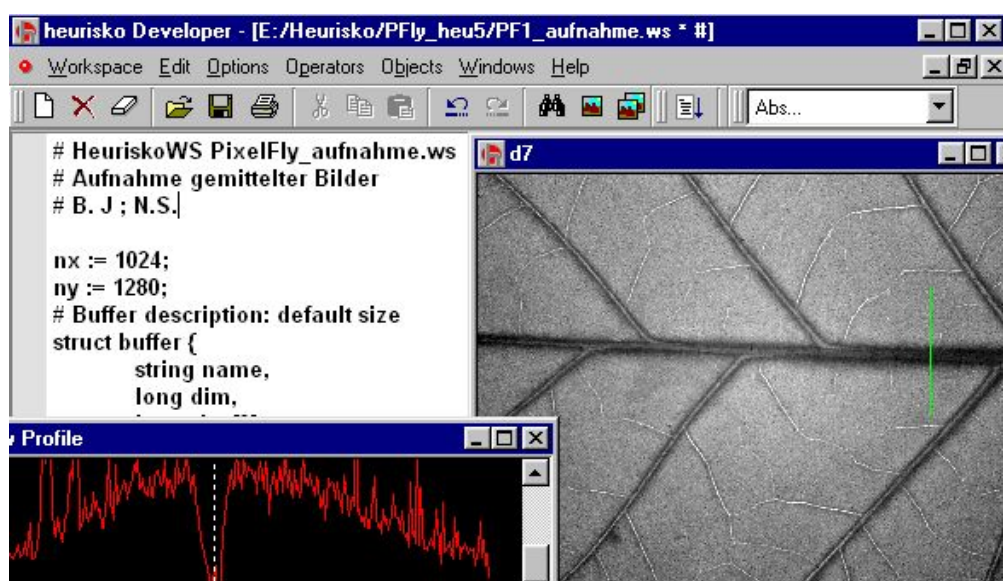


Abb.5.1.5: Heurisko-Workspace "Bildaufnahme", ein Livebild und Grauert-Spaltenprofil für die Spektralaufnahme eines Tabakblattes.

Nach der Bildeinrichtung wird der Workspace gestartet, mit dem die Bildaufnahme beginnt. Spektralbilder von Pflanzenblättern werden in den Absorptionsmaxima und Minima untersuchter Substanzen (Chlorophyll, Wasser) (Abb.5.1.3) aufgenommen. Zur Ermittlung der Blattbilder in ganzem Spektrum wurden die Aufnahmen mit dem vollen Filtersatz gemacht. Dafür genügt es, die Messungen mit einem Intervall von 20-50 nm zu machen. Eine feinere Spektreninterpretation erfordert den Einsatz eines Filtersatzes mit einem kleineren Intervall.

Auswertung der spektralen Bildsequenz

Auch die Auswertung der Spektralbilder geschieht mit Hilfe spezieller Heurisko-Workspaces. Diese Algorithmen wurden speziell für die Auswertung der Spektraldaten geschrieben. Zunächst berechnet der Workspace "Transmission" in der im folgenden

beschriebene Weise die Transmissionsbilder. Danach werden Extinktions- und Absorptionsbilder ermittelt und gespeichert. In diesem Unterprogramm werden auch die Chlorophyll- bzw. Wasserprofile am Blatt berechnet und andere Spektralauswertungen ausgeführt. Neben der Spektralauswertung enthält der Algorithmus Korrekturen bezüglich Dunkelstrom und defekter Pixel. Die volle Version des Heurisko-Workspaces "Absorption" ist im Anhang 1 dargestellt. An dieser Stelle werden nur die Etappen dieser Bildverarbeitung gezeigt, deren Ziel die Ermittlung der Absorptionsbilder ist.

Dunkelstrom- und Fehlerpixelkorrektur

Für eine Verbesserung der Grauwert-Bilder, das heißt für die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden 16 Bilder pro Aufnahme gemittelt. Danach wurden von den Rohbildern die Dunkelstrombilder der gleichen Belichtungszeiten abgezogen. Jedes Dunkelstrombild (Dunkelbild) wurde jeweils vor der Bildaufnahme bei dem lichtdicht abgedeckten Kameraobjektiv aufgenommen.

In Abbildung 5.1.6 kann man klar erkennen, daß ein Bild des Offset eine Rauschsignatur enthält. Ebenfalls kann man ein sich wiederholendes Muster der hellen Flecken von Fehlerpixel sehen. Sie haben ihren Grund in Produktionsungenauigkeiten und Verunreinigungen im Chip. An diesen Stellen ist die Empfindlichkeit des CCD um bis zu max. 6% kleiner. Beide Effekte haben Ihre Ursache in der Art, wie die Elektronen, die vom einfallenden Licht im CCD erzeugt und gemessen werden. Für jeden Pixel des Sensors müssen diese Korrekturen gemacht werden, um ein homogenes Bild zu erhalten.

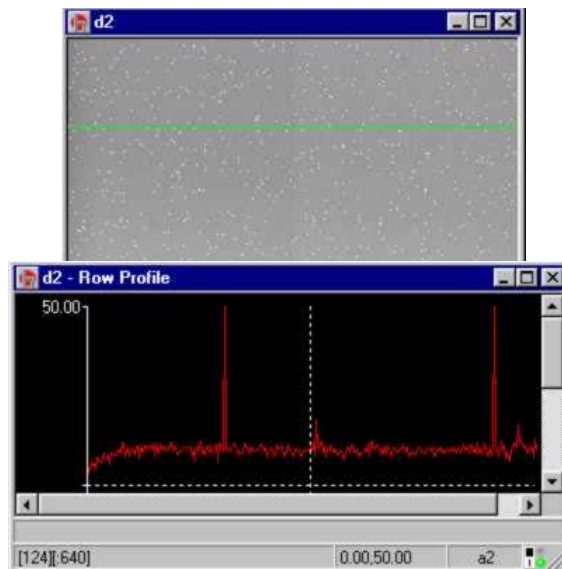


Abb.5.1.6: Dunkelstrombild der CCD-Detektor (PixelFly Kamera).

Spektrale Auswertung

Die nach dem Dunkelstrom-Subtrahieren erhaltenen Bilder wurden danach etappenweise wie folgt bearbeitet:

- Auswertung der Transmissionsbilder $T(\lambda_n) = I(\lambda_n) / I_0(\lambda_n)$
- Auswertung der Extinktionsbilder $E(\lambda_n) = -\log T(\lambda_n)$;
- Auswertung der Absorptionsbilder $A(\lambda_n) = E(\lambda_n) - E_{\lambda}^{\prime}(\text{MLS})$ und zwar die Subtraktion des MLS-Untergrundes $E_{\lambda}^{\prime}(\text{MLS})$ von den Extinktionsbildern. Dafür wurde jeweils das MLS-Mittelniveau im Bereich der Absorptionsbande nach drei Meßpunkten ausgerechnet (Abb.5.1.7)

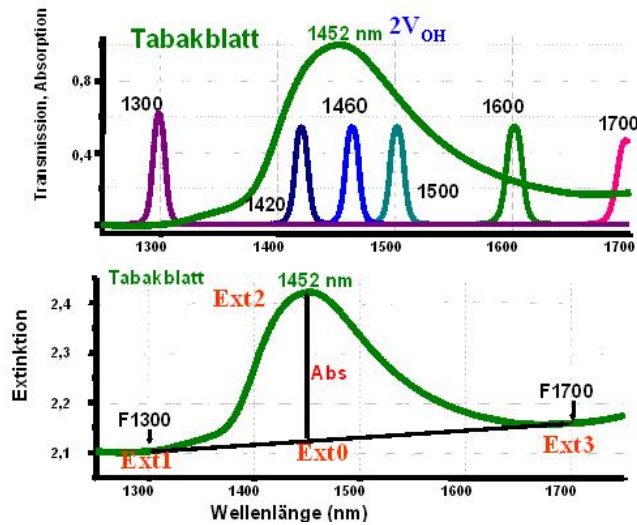


Abb.5.1.7: Subtrahieren des MLS-Mittelniveaus zur Auswertung der Absorptionbilder.

Interpretation und grafische Aufarbeitung der Resultate

Die Bildverarbeitung der Bildsequenzen mit dem "Absorption"-Workspace ergab die gewünschte Information über die Zeitdynamik des Blattwassergehaltes. Eine Kombination der räumlichen und zeitlichen Verteilung des Wassergehaltes erhält man, indem mehrere Momentaufnahmen oder Zeitreihen von Blattaufnahmen kombiniert werden. Eine übersichtliche und einfache Darstellung der Resultate ergibt sich, wenn verschiedene Zeilen- und Spaltprofile z.B. an Basis, Mitte und Spitze des Blattes ausgewählt und grafisch ausgegeben werden (Abb.5.1.8). Dabei kann eine Profilkarte des Blattwassers mit Hilfe einer Normierung der Absorptionen auf den Absorptionsgrad einer 1 mm dicken Wasserschicht gewonnen werden. Die Werte der Wasserabsorption werden ausgerechnet und die effektiven Wasserdicken am Blatt wurden numerisch dargestellt (Kapitel 7.2.1). Mittels einer ähnlichen Auswertung wurde die Chlorophyllverteilung am Blatt untersucht (Kapitel 6.3.).

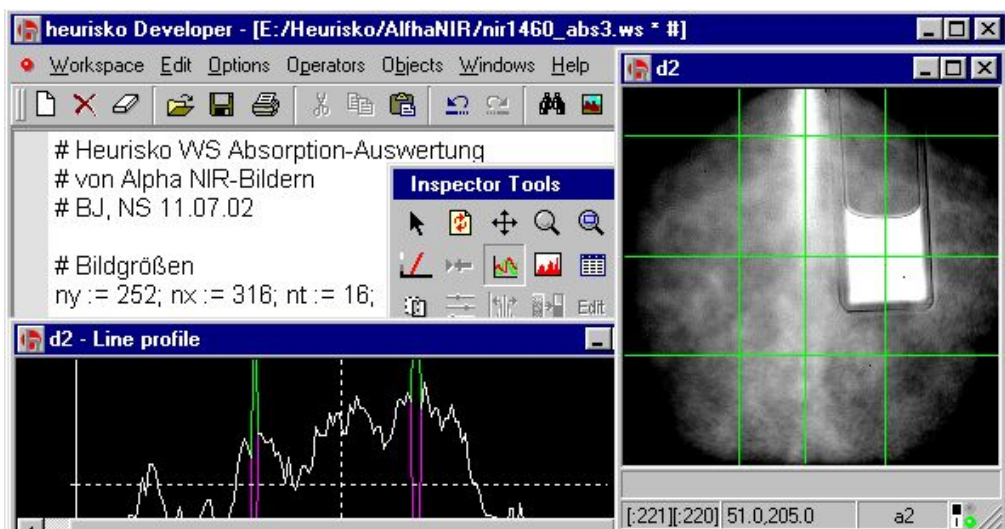


Abb.5.1.8: "Absorption"-Workspace zur Auswertung und Darstellung von Bildern der Wasserverteilung an einem Kalanchoe Blatt mit einer 1mm dicken Wasserküvette zur Kontrolle. Zeilen- und Spaltprofile zeigen den Wassergehalt in jedem Blattpunkt.

5.1.5. Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse (DSA)

Die quantitative Spektralanalyse der Bildsequenzen wurde mit Hilfe der DSA-Methode (Abb.5.1.9) durchgeführt. Diese Methode wurde zusammen mit Dr. M. Korniyenko (Tarasa Schewtschenko Universität, Kiew, Ukraine) entwickelt. Die Methode ermöglicht es, verschiedene Spekrtypen nach den Desitogrammen der Spektralbilder grafisch darzustellen und somit die Spektralanalyse duchzuführen. DSA ist ideale Erweiterung für bildgebende Spektroskopie, mit ihr wird es möglich, für die gewünschten Substanz und für jeden Punkt der Blattoberfläche das dazugehörige optische Spektrum zu erhalten. Somit wurden die spektrale Daten der gesamten Blattoberfläche erfasst. Densitogramme der Spektralbilder geben die statistische Verteilung der Transmissions- bzw. Absorptionswerte bezogen auf die Pixelanzahl mit den gleichen Grauwerten wieder. Sie sind ein Verbindungsglied zwischen den räumlichen Spektralbilder und den Spektralcharakteristiken des Objektes. Die DSA Methode läßt Spektralcharakteristiken der Untersuchungsobjekte detailliert auswerten. Dieses ist besonders wichtig für jene Objekte, die mit Hilfe der traditionellen Spektroskopie kaum untersucht werden kann.

DSA arbeitet perfekt mit Software Heurisko zusammen. In den Densitogrammen werden schwache Signale von den getrennten Objektbereichen der gleichen optischen Eigenschaften in einem Maximum zusammengefaßt (Kapitel 2.3.1). Im Gegenteil zu den integrierten Signalen, die in den traditionellen Spektrometern realisierbar werden, ist eine Familie der spektralen Densitogramme eine Mehrkanalan-Signalsammlung von den Objektpunkten der ähnlichen spektralen Eigenschaften. Mit Hilfe der DSA kann man gleichzeitig die Analyse des ganzen Objektes sowie seiner Einzelkomponenten ohne zusätzliche Messungen durchführen. Sogar für eine Substanz des Objektes treten mehrere Maxima in den Densitogrammen bei den verschiedenen Wellenlängen hervor. Es ermöglicht gleichzeitig mehrere Spektren zu gewinnen, die den verschiedenen Zuständen einer Substanz entsprechen. Zusätzlich kann man die Spektren für die Lage oder Intensität der Densitogramm-Maxima ermitteln. Durch die Analyse dieser Spektren kann man die quantitative Werte jeder Teilmenge von Objektpunkten mit den geänderten Eigenschaften und räumliche Verteilung dieser Eigenschaften auswerten.

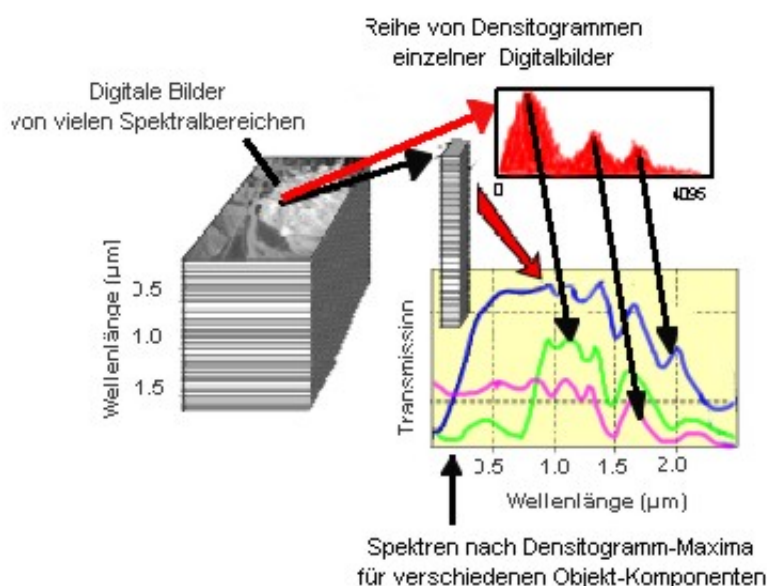


Abb.5.1.9: Prinzipielles Schema der Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse.

Mit Hilfe der DSA-Methode wurde die orts aufgelöste Spektralanalyse vom Chlorophyll und Wasser der verschiedenen Pflanzenblätter geleistet (Kapitel 6.3 und 7.2). Zum ersten Mal wurden die verschiedenen Wasserzustände auf solche Weise analysiert (Kapitel 7.3). Ebenso zum erstenmal wurden mit Hilfe der DSA räumliche Spektren (Raumspektren) erhalten, die die kollektiven Eigenschaften der Moleküle und ihr Verhalten als einheitliches Ensemble charakterisieren. Keine der zur Zeit existierende spektral-optischen Methoden ermöglicht ähnliche Analysen zu machen.

Fazit

- Eine innovative Methode der bildgebenden Spektroskopie zur Ermittlung der orts- und zeitaufgelösten Spektralcharakteristiken eines Objektes und seiner Substanzen wurde entwickelt. Die entwickelte Methode kommt überall dort zum Einsatz, wo ein hochaufgelöstes spektrales Bild benötigt wird.
- Ein Modell des 4D bildgebenden Goniometer-Spektrometers für VIS und NIR Bereich wurde aufgebaut. Das entwickelte 32-Kanälen-CCD-Spektrometer verfügt über eine große Sensibilität und ist für die Untersuchung der optisch inhomogenen Feststoffe wie biologische Gewebe und viele andere Naturmedien (Wolken, Sand) geeignet. Das bildgebenden CCD-Spektrograph wurde für die anspruchsvollste Spektralanalyse an Pflanzenblättern entwickelt. Dieses Spektrograph eignet sich insbesondere für Applikationen, die eine hohe örtliche und spektralen Auflösung erfordern und insbesondere bei der Spektralanalyse der Chlorophyll- und Wasserproben.
- Eine prinzipiell neue Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse wurde entwickelt. DSA hat die einzigartigen Vorteile für die spektrale Extrahierung der Teilmengen von ein und derselben Substanz (Wasser, Chlorophyll), die verschiedene energetische Zustände besitzt.
- Neben der Untersuchung von Pflanzenblättern wurden Methode der bildgebenden Spektroskopie auch für die Erforschung von Sand-Wasser System verwendet. Es hat ermöglicht, sowohl verschiedene Wasserzustände im Pflanzengewebe als auch verschiedene Zustände vom Adsorptions- und Kapillarwasser im Sand zu studieren.
- Die weiteren Anwendungen dieser Methode könnten für die Untersuchung sowohl von Mikroobjekten (Physik, Biologie, Chemie) als auch von Makroprozessen (Planet, Atmosphäre, Kosmos) von großer Bedeutung sein.

5.2. Methode der ortsaufgelösten Spektroskopie

Eine Entwicklung des Verfahren der ortsaufgelösten Spektroskopie für die Untersuchung der räumlichen Spektralcharakteristiken an Pflanzenblättern stellt ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit dar. Diese Methode ermöglicht die Herstellung, Bearbeitung und Analyse von Bildspektren. Die Aufnahme der Bildspektren wurden mit Hilfe eines in Rahmen dieser Arbeit entwickelten CCD-Prismenspektrometers ausgeführt. Die Bildspektren wurden mittels der ebenfalls speziell dafür entwickelten Bildverarbeitungsverfahren bearbeitet und analysiert. Dies ermöglichte die ortsaufgelösten Spektralcharakteristiken vom Blatt zu untersuchen, die wichtige Informationen über die Wechselwirkungsprozesse des Lichtes mit dem Blattgewebe und über die strukturellen Besonderheiten des Blattes liefern können.

Bildspektrum

Ein Bildspektrum ist ein zweidimensionales spektral-räumliches Digitalbild von einem Objekt, in dem auf einer Dimension die Rauminformation und auf der zweiten Dimension die spektrale Information abgebildet ist.

Prinzip der ortsaufgelösten Spektroskopie

Bei der spektralen Bildverarbeitung werden gleichzeitig räumliche und spektrale Information aufgenommen und ausgewertet. Hierfür muß ein Imaging Spektrograph eingesetzt werden, der die Information einer Bildlinie auf einen zweidimensionalen Kamerachip abbildet. Als Daten stehen die spektralaufgelösten Bildausschnitte zur Verfügung.

Im allgemeinen bedeutet die ortsaufgelöste Spektroskopie:

- Die Aufnahme eines Streifens (einer Linie) vom Objekt in einem breiten Spektralbereich, wobei die Strahlung über einen Monochromator in die einzelnen Wellenlängen zerlegt und auf die einzelnen Bildzeilen eines CCD-Sensors abgebildet wird. Dabei wird in den Bildspalten die räumliche Information gespeichert.
- Durch Scanning des Monochromator-Spaltes könnte das ganze Objekt in Form von Sequenzen von Bildspektren abgetastet werden. Eine über das Objekt gescannte Sequenz der Bildspektren liefert räumliche Verteilung der Spektralcharakteristiken von ganzem Objekt.
- Anschließend erfolgt die digitale Bearbeitung der Bildspektren, um die auf solche Weise gespeicherte Informationen über Spektralcharakteristiken des untersuchten Objektes zu ermitteln und zu analysieren.

5.2.1. Aufbau und Funktion des CCD-Prismenspektrometers

Für die automatisierte Aufnahmen der Bildspektren im VIS-NIR Bereich 400-1050 nm wurde ein goniometrisches 2D CCD-Prismenspektrometer entwickelt. Aufbau, Justieren und Eichung des CCD-Prismenspektrometers bilden einen bedeutenden Teil der vorliegenden Arbeit. Dieses Spektrometer ist eine Art von bildgebendem Dispersiv-Spektrograph und besteht aus einer Lichtquelle, einem Prismenmonochromator und einem CCD-Detektor. Der Spektrograph ist ein ortsauflösenden Spektrograph und nützt die Transmissions-prismentechnologie. Das Bild eines Streifens mit Hilfe eines Durchsichtprisma wird spektral zerlegt und direkt auf den Chip einer CCD-Kamera abgebildet wird. Das Abbild des Objektes wird in den Bildspalten durch die räumliche Auflösung, in den Zeilen durch die spektrale Auflösung in der Wellenlänge erzeugt. Somit trägt jedes Bild in der einen Richtung die Ortsinformation und in der zweiten Achse das

Spektrum für jeden Punkt der registrierten Linie. Der goniometrische Aufbau des Spektrometer-Systems ermöglicht es die gesamten Transmissions- und Reflexionscharakteristiken vom Objekt zu studieren. Das entwickelte Modell des CCD-Spektrometers arbeitet ohne optomechanischen Scanner. Ein Scanner könnte dieses Gerätes zu einem kompletten Labormessgerät erweitern.

Das Blockschema des CCD-Spektrometers ist in Abb.5.2.1. dargestellt. Alle optischen Bestandteile liegen exakt auf der optischen Achse der Apparatur.

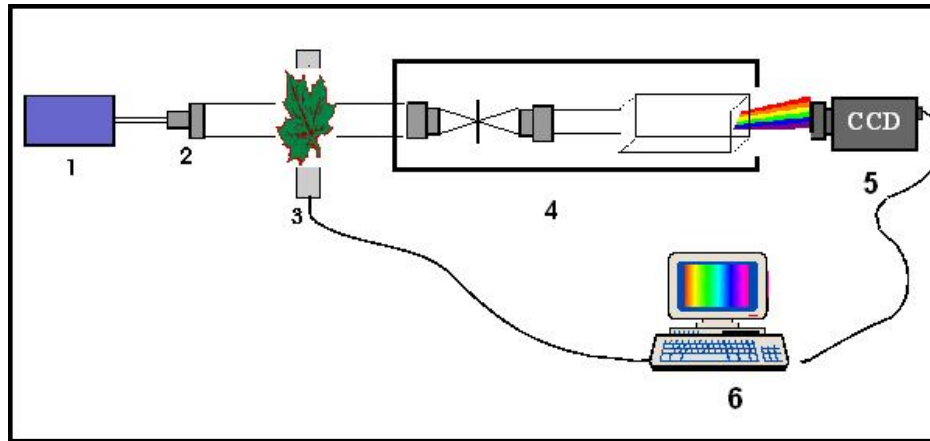


Abb.5.2.1: Aufbauschema des ortsaufgelösten CCD-Spektrometersystem:
 1 - Beleuchtungsquelle; 2 - Kollimator; 3 - Objekt (ein Pflanzenblatt); 4 - Prismenmonochromator;
 5 - CCD-Kamera; 6 - Computer mit der Bildverarbeitung-Software.

Lichtquelle

Als Lichtquelle dienen eine Xenon- bzw. Halogenlampe. Die Xenonlampe (CXE 300S, Cermax) liefert kontinuierliches Licht im Wellenbereich 200-800 nm und die Halogenlampe (Endolux; Classe&Co GmbH) im Spektralbereich 300-2500 nm. Normalerweise wird bei der Messungen im VIS Spektralbereich durch einen Wärmeschutzfilter der größte Teil der NIR Strahlung ab 800 nm aus dem Spektrum der Lampe ausgefiltert, um die Apparatur und das Pflanzenblatt nicht unnötig aufzuheizen. Im Gegensatz zu den anderen Beleuchtungsquellen hat die Halogenlampe den Vorteil eines "kontinuierlichen" Spektrums entsprechend einer Planckkurve mit $T=3300\text{K}$. Damit läßt sich annähernd das Tageslichtspektrum abdecken. Die Irisblende gestattet es, die Lichtintensität zu regeln, ohne die Lampe durch eine Veränderung der Spannung dimmen zu müssen, so daß das Lichtspektrum konstant bleibt.

Das Lampenlicht wird durch einen Lichtleiter und mit einem Kollimator zu einem Parallelbündel geformt. Die verwendete Faser unterstützt Wellenlängen aus dem Bereich 380-1600 nm. Am Ende der Glasfaser befindet sich ein Kollimator. Dies ist im wesentlichen ein Linsensystem mit verstellbarem Fokus, das das aus der Glasfaser austretende Licht zu einem paralleles Strahlenbündel kollimiert. Außerdem ergibt sich hiermit eine gleichmäßigere Lichtverteilung über den Querschnitt. Das Blatt wird durch den Kollimator nahezu kontinuierlich beleuchtet, wobei kaum ein Intensitätsabfall entlang der Aufnahmelinie entsteht.

Monochromator

Das Kernstück des Spektrometers bildet der Prismenmonochromator, der das Licht von einem Objekt in eine spektrale Verteilung am Bildort umsetzt. Damit wird sie für eine Messung mit einer CCD-Kamera zugänglich gemacht.

In Abb.5.2.2. ist der Prismenmonochromator dargestellt. Er besteht im wesentlichen aus drei Objektiven (Xenoplan 1.9 / 35 von Schneider/Kreuznach) mit einer Brennweite von $f=35$ mm, einem Präzision-Spektralspalt von $10\ \mu\text{m}$ Breite und 22 mm Länge, dem Geradsichtprisma Amichi und einem Schirm, der in diesem Fall durch den CCD-Chip der Kamera ersetzt ist. Das Transmissionslicht tritt durch das erste Objektiv (1) in die Apparatur ein und wird auf die Bildebene scharf abgebildet. Dort befindet sich der Spalt (2), der wiederum in der Brennebene des darauffolgenden Objektivs (3) sitzt. Der Spalt hat für das Prismenspektrometer eine entscheidende Aufgabe, das Licht in einer Richtung so schmal zu machen, um nach der Zerlegung im Prisma eine ausreichende Wellenlängenauflösung erzielen zu können. Da der Spalt sich in der Brennebene des zweiten Objektivs befindet, tritt das Licht im Idealfall daraus parallel aus. So trifft es auf das Prisma (4). Prismen werden aus Materialien hergestellt, deren Brechungsindex n wellenlängenabhängig ist (*Dispersion*). Da die Ablenkung eines Lichtstrahls beim Durchgang durch das Prisma von n bestimmt wird, kann polychromatisches Licht so spektral zerlegt werden. In der Regel wird langwelliges Licht schwächer gebrochen als kurzwelliges, da der Brechungsindex mit abnehmender Wellenlänge zunimmt (*normale Dispersion*). Das verwendete Amichi Geradsichtprisma zeigt im gesamten VIS und NIR Bereich eine normale Dispersion. Das letzte Objektiv (5) fokussiert paralleles Licht auf die Brennebene der CCD-Kamera (6). Dort entsteht ein Bildspektrum (Abb.5.2. 5).



Abb.5.2.2: Prismenmonochromator des ortsaufgelösten CCD-Spektrometers:
 1,3,5 - Objektiv (Brennweite $f=35$ mm); 2 - Präzision-Spektralspalt ($10\ \mu\text{m}$ Breite);
 4 - Geradsichtprisma Amichi; 5 - CCD-Kamera.

Das Geradsichtprisma wurde so positioniert, daß die mittlere Wellenlänge des beobachteten Spektrums einen symmetrischen Durchgang durch das Prisma hat und auf den mittleren Kanal vom CCD-Chip trifft. Winkelkorrekturen sind allerdings immer noch möglich; die CCD- Kamera und die Prismenhalterung können um etwa 10 Grad variiert werden. Diese Spektrum-Positionierung auf den CCD-Chip ist deshalb ausgewählt, weil damit ein Spektralbereich von 400 bis zu den 1050 nm, in dem die Kamera noch empfindlich ist, aufgenommen werden kann. Es ermöglicht die Absorptionsbanden vom Chlorophyll im VIS Bereich bei 450 und 680 nm und vom Blattwasser im NIR Bereich bei 850 und 970 nm zu registrieren (Kapitel 6 und 7).

Alle Bestandteile des Monochromators wurden auf einer Profilschiene (OWIS, SYS 65) montiert. Das ganze CCD Spektrometer-System wurde auf eine Goniometer-Drehplatte oder direkt auf einem optischen Tisch befestigt (Abb.5.2.3.). Der hochstabile optische Tisch erlaubt eine präzise und schwingungslose Montage des gesamten Meßaufbaus. Der goniometrischen Aufbau des CCD-Spektrometers erlaubt Spektralcharakteristiken des Pflanzenblattes im Transmissions- und Reflexionslicht zu erforschen.

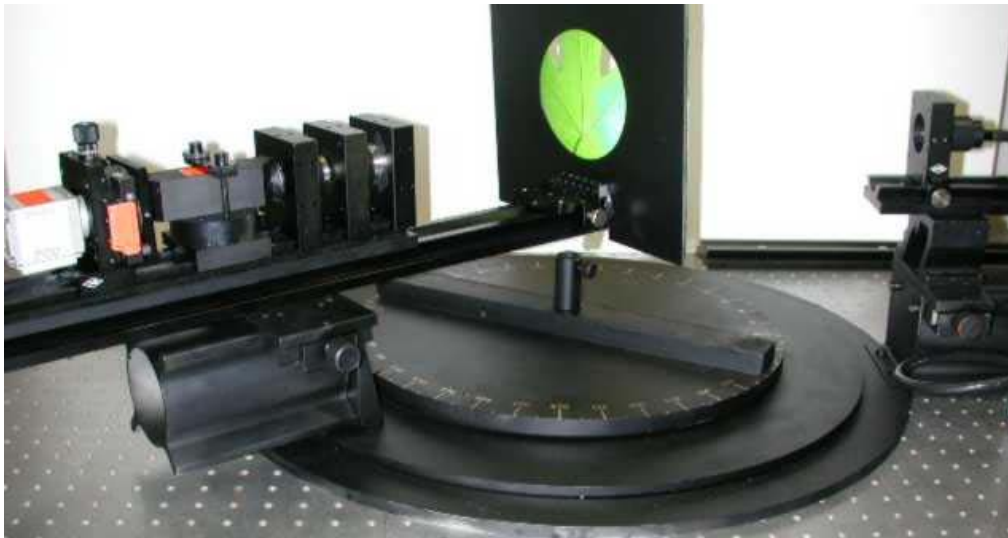


Abb.5.2.3: Messaufbau des CCD Goniometer-Spektrometers im Labor.

Geradsichtprisma Amichi

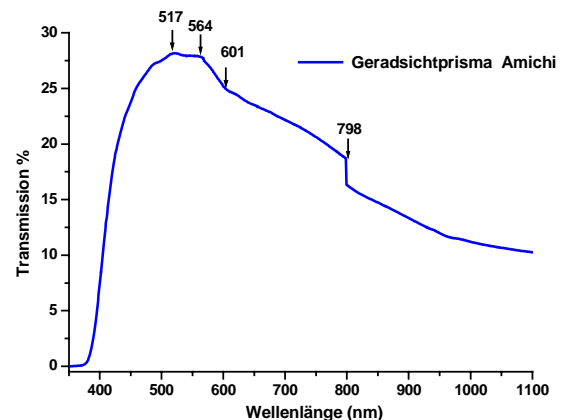
Der ganze Versuchsaufbau wird dank des Einsatzes eines Amichi Geradsichtprisma (Abb.5.2.2 (4)) wesentlich vereinfacht im Vergleich zu den konventionellen Prismengeräten, bei denen die Dreieckprismen verwendet werden. Das Amichi Geradsichtprisma (Linos, Göttingen) ist aus drei Bestandteilen zusammengeklebt, wobei zwei Prismen aus SS14 Glas und eine aus BK-7 hergestellt sind.

Technische Daten vom Geradsichtprisma:

Abmessungen	30 x 30 x 106 mm;
Öffnung	30 x 18 mm;
Spektralbereich	300 - 2300 nm;
Winkeldispersion	$\Delta\varepsilon=4^\circ 35'$;

Keine Strahlableitung für $\lambda = 587,6$ nm.

Abb.5.2.4: Transmissionsspektrum des Geradsichtprismas



Das Transmissionsspektrum des Geradsichtprisma für den Arbeitsbereich 400-1100 nm des CCD-Spektrometers ist in Abb.5.2.4. gezeigt. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, sollten die Durchsichtigkeitscharakteristiken des Prismas bei der Spektralauswertung berücksichtigt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die radiometrische Kalibrierung des gesamten CCD-Spektrometersystems erreicht. Damit werden die optischen Parameter von allen Bestandteilen des Spektrometers einbezogen.

Detektor

Für die Aufnahme der Bildspektren wurde die PixelFly CCD-Kamera (PCO GmbH; Kelheim) eingesetzt. Prinzipiell kann der spektrale Aufnahmebereich an die experimentelle Zielsetzung durch die Auswahl verschiedener Kameras und dispersiver Elemente (Prisma, Gitter) angepaßt werden. Die verwendete PixelFly CCD-Kamera ist im Spektralbereich 300-1050 nm empfindlich. Die Einzelheiten dieser Kameras sind in

Kapitel 4.2 aufgelistet. Bei Verwendung des Geradsichtprismas und der PixelFly Kamera sind Messungen im Bereich zwischen 400 nm und 1050 nm bei einer verifizierten Auflösung von ca. 1 nm/Pixel möglich. Die PixelFly Kameras (VGA und Scientific) enthalten eine CCD-Matrix mit 640x480 bzw. 1280x1024 Pixel je nach Modell. Das Signal setzt sich dabei aus den 4096 Grauwertestufen pro Pixel zusammen (12 Bit Auflösung). Diese Möglichkeit erlaubt einen weiten Bereich detektierbarer Intensitäten bei konstanter Belichtungszeit. Darüber hinaus konnte die Belichtungszeit zwischen 10 µs und 10 s variiert werden.

5.2.2. Technische Durchführung des Verfahrens

Justieren des CCD Spektrometersystems

Das Justieren des Systems stellte sich als eine aufwendige Aufgabe heraus. Bedingt durch die Möglichkeit, die meisten Komponenten verschieben oder verkippen zu können, hat das Spektrometer viele Freiheitsgrade, die die optischen Feineinstellungen erst möglich machen, aber diese eben auch etwas komplex werden lassen.

Zum Justieren des Prismenspektrometers ist es vorteilhaft, eine Lichtquelle mit der bekannten spektralen Linien im sichtbaren Wellenlängenbereich zu benutzen. Solche Lichtquelle kann man zugleich zur Wellenlängen-Kalibrierung des CCD-Spektrometers verwenden. Dazu wurde Quecksilber-Argon Kalibrierungslampe (Hg/Ag Lampe) angepaßt.

Am besten beginnt man mit der Feinstellung der Bestandteile des Monochromators, um zu gewährleisten, daß das Spektrum auf den CCD-Chip der Kamera trifft. Um den CCD-Chip in der Brennebene des Objektivs zu positionieren, ist es am einfachsten dieses soweit in die Kamera hineinzudrehen, bis die Hg- und Ag-Linien der Kalibrierungslampe auf dem CCD-Chip scharf abzubilden werden (Abb.5.2.6). Der Eintrittsspalt muß parallel zu den CCD-Spalten auftreten, was mit dem vertikalen Inspektor (Software "Heurisko") geprüft wird und die CCD Kamera wird nachjustiert. Mit Hilfe der Spektrallinien der Hg/Ag Lampe kann man die parallele Einstellung des Eintrittsspalt zu den CCD-Spalten sehr präzise durchführen.

Aufnahme der Bildspektren

Nach erfolgter Positionierung von Blatt und Spektrometersystem wird der Bildverarbeitungs-Interpreter "Heurisko" gestartet. Durch Aufruf des Workspaces "Bildaufnahme" erhält man eine Livebildanzeige auf dem Monitor des Rechners, mit deren Hilfe das Bild in Schärfe und Helligkeit optimiert wird. Abbildung 5.2.5 zeigt die Roh-Bildspektren von dem Beleuchtungslicht und von einem Tabakblatt.

Bildspektrum

Ein Bildspektrum ist ein 2D Digitalbild, in dem entlang der Y-Achse (spatial direction) die Rauminformation und entlang der X-Achse (spectral direction) die spektrale Information abgebildet ist (Abb.5.2.5). Die Spaltenrichtung im Bildspektrum zeigt einen registrierten Streifen (ideal eine Linie) vom untersuchten Blatt. Meistens wurde eine Linie ca. 4 cm lang abgebildet. Entlang einer Zeile steht jede Spalte für eine andere Wellenlänge. Dies beginnt bei 430 nm (1. Spalte) und endet bei ca. 1000 nm (640. Spalte). Das Zeilenprofil des Bildes zeigt ein Transmissionsspektrum für jeden Punkt der abgebildeten Blattlinie. Für die quantitative Analyse der Bildspektren muß die X-Achse zur Wellenlänge geeicht werden. Auf dem Bildspektrum des Tabakblattes sind Blau- und Rot-Absorptionsbanden von Chlorophyll leicht erkennbar.

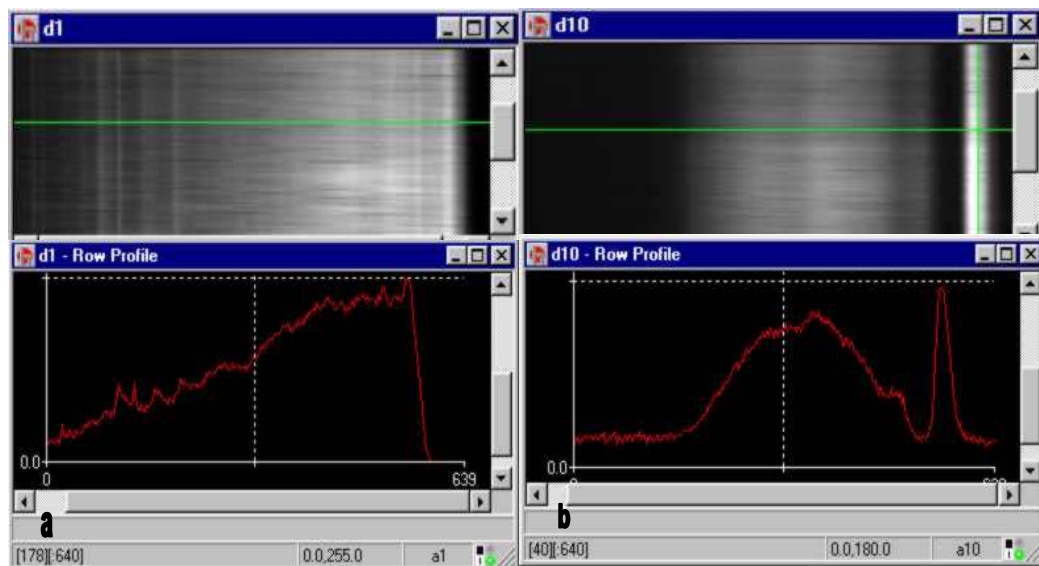


Abb.5.2.5: Roh-Bildspektren und Grauwert-Zeilenprofile von dem Xenon-Beleuchtungslicht (a) und von einem Tabak Blatt(b). Die Zeilenprofile zeigen die Transmissionsspektren für einem Punkt der abgebildete Linie.

Datenaufbereitung

Zur quantitativen Auswertung der Bildspektren muß eine eindeutige Wellenlängezuordnung möglich sein. Dazu ist es notwendig, den funktionalen Zusammenhang zwischen λ und X-Bildkoordinaten zu kennen. Für die Spektralanalyse müssen die Grauwerten der Roh-Bildspektren in spektrale Transmissionswerte umgewandelt werden. Diese Vorgänge nennt man Datenaufbereitung. Die Datenaufbereitung für die Bildspektren besteht aus den folgenden Schritten:

- Dunkelstrom- und Fehlerpixelkorrektur ;
- Wellenlängeneichung;
- radiometrische Kalibrierung;
- Ermittlung des Transmissions- bzw. Absorptions-Bildspektrum.

Dunkelstrom- und Fehlerpixelkorrektur

Für eine Verbesserung der Grauwert-Bilder, das heißt für die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und Bildfehlerkorrektur, wurden von den Rohbildern die Dunkelstrombilder abgezogen. Für jeden Pixel des Bildes muß diese Korrektur gemacht werden, um ein homogenes Bild zu erhalten. Dafür wurde jedesmal vor der Bildaufnahme ein Dunkelbild gemessen. Man verschließt das Kameraobjektiv lichtdicht und nimmt ein Dunkelbild auf (Dunkelstromsignal für jedes Pixel).

Wellenlängeneichung

Ein Teil der Datenaufbereitung ist ein Kalibrationsverfahren für die spektrale Eichung zwischen den Bildpixelnummern und der Wellenlänge. Die Kalibration von spektralen Bilddaten, die mit dem CCD-Spektrometer aufgenommen werden, erfordert spezielle Kalibrationsmessungen jeweils vor der Messung. Die spektrale Kalibrierung geschieht unter Verwendung einer geeichten Lichtquelle. Für die Wellenlängeneichung wurde ein Referenzspektrum der Quecksilber-Argon Spektrallampe verwendet (Kapitel 4.2). Die bekannten Wellenlängen der einzelnen Quecksilber- und Argon-Emissionslinien können den Pixelnummern, bei denen diese Linien beobachtet werden, zugeordnet werden. Damit wurde die Kalibration der Wellenlängenskala möglich.

Das Bildspektrum der Hg/Ag-Emission wurde auf dem Monitor eines Computers betrachtet und das Prisma um die vertikale Achse gedreht, bis die gewünschte Wellenlängen-Positionierung an den Bildpixeln erzielt wurde. Die Absorptionsbanden der Chlorophylle liegen im VIS Bereich von 400 bis 700 nm. Um das ganze Chlorophyllspektrum zu erfassen, wurde das Geradsichtprisma so positioniert, daß die mittlere Wellenlänge des beobachteten Spektrums bei ca. 550 nm auf den mittleren Kanal des CCD-Chip trifft. Dabei hat das Lichtbündel einen symmetrischen Durchgang durch das Prisma, weil dieses keine Strahl-Ablenkung für die Wellenlänge $\lambda = 587,6$ nm hat. Das Grauwertbild, das mit der CCD Kamera aufgenommen wird, ist 640 x 480 Pixel groß. Deswegen wird bei dem Justieren die grüne Spektrallinie bei 546 nm der Quecksilber-Argon-Kalibrierungslampe in Bildmitte (Pixel Nr. 320) gelegt.

In Abb.5.2.6 ist das Grauwert-Bildspektrum der Hg/Ag Kalibrierungslampe, das mit dem CCD-Spektrometer aufgenommen wurde und das Zeilenprofil dieses Bildes dargestellt. Zusätzlich wurde das Emissionsspektrum von der Hg/Ag Kalibrierungslampe mit dem HP 8453 Spektrometer gemessen und entsprechende Wellenlängenwerte der beobachteten Spektrallinien bestimmt (Abb.5.2.7a).

Abb.5.2.6: Bildspektrum der Spektrallinien der Hg/Ag Kalibrierungslampe, das mit dem CCD-Prismenspektrometer aufgenommen wurde.

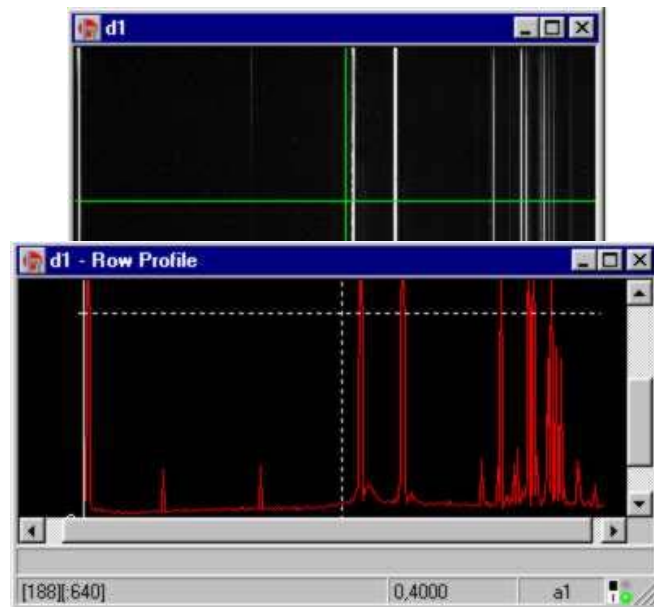


Abbildung 5.2.7b zeigt die Kurve der Zuordnung der Bildspalten und Wellenlängen der Hg/Ag Emissionslinien. Aus den Wellenlängenwerten der Quecksilber- und Argon-Spektrallinien wurde eine Exponentialfunktion interpoliert, welche in Abb.5.2.7b die rot gezeichnete Kalibrierungsfunktion ergab. Die Parameter dieser Kalibrierungsfunktion sind in Abbildung ebenfalls angegeben.

Um ein gemessenes Bildspektrum in ein geeichtes Bildspektrum zu transformieren, wurde der Heurisko-Workspace "*Wellenlängeneichung*" geschrieben (Anhang 3). Dadurch wurde es möglich die registrierten Spektralbanden zu interpretieren und damit die quantitative Spektralanalyse der Bildspektren durchzuführen.

Abbildung 5.2.6 verdeutlicht auch eine gute spektrale Auflösung des Spektrometers. Das Bildspektrum umfaßt einen Spektralbereich von 430-1050 nm. Das heißt 640 Bildpixel entsprechen 620 nm. Daraus folgt, daß die mittlere spektrale Auflösung ist:

$$a = 620 \text{ nm} / 640 \text{ Pixel} = 0,97 \text{ nm/Pixel.}$$

Es bestätigt auch die sichtbare Trennung von zwei gelben Spektrallinien des Quecksilbers von 577 und 579 nm. Da die Dispersion des Prismas im Langwellenbereich des Spektrums kleiner als im Kurzwellenbereich ist, unterscheidet sich die spektrale Auflösung in den blauen und roten Spektrumbereichen:

$$a_b = 550 - 430 \text{ nm} / 320 \text{ pixel} = 120 \text{ nm} / 320 \text{ Pixel} = 0,375 \text{ nm/Pixel}$$

$$a_r = 1050 - 550 \text{ nm} / 320 \text{ Pixel} = 500 \text{ nm} / 320 \text{ Pixel} = 1,562 \text{ nm/ Pixel.}$$

Die Abb.5.2.8 zeigt ein Bildspektrum des Rizinusblattes vor und nach der Kalibrierung. Das Bildspektrum wurde mit Hilfe des Heurisko-Workspaces "*Wellenlängeneichung*" in ein spektral kalibriertes Bildspektrum transformiert. Auf dem Ergebnisbild kann man

eindeutig die Blau- und Rotbanden von Chlorophyll mit den Maxima bei 450 nm und 680 nm identifizieren und analysieren, da Bildspalten mit den Wellenlängen zugeordnet sind.

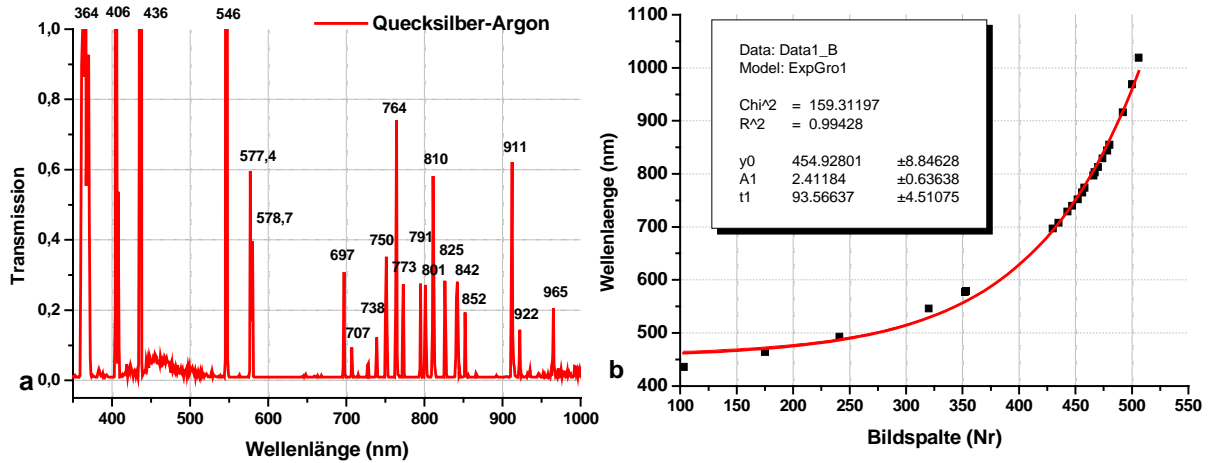


Abb.5.2.7: Spektrum der Hg/Ag Kalibrationslampe (a) und Kalibrierungskurve für die Zuordnung der Bildspalten und Wellenlängen (b).



Abb.5.2.8.: Bildspektrum des Rizinus Blattes vor (oben) und nach(unten) der Spektalkalibrierung

In Abb.5.2.9 sind Zeileninspektor des kalibrierten Bildspektrums und die kalibrierten Transmissionsspektren eines Rizinus Blattes dargestellt. Die Spektren wurden mittels der Software Origin für verschiedene Punkte entlang der abgebildeten Blattlinie ermittelt. Auffällig ist die Präzision des Verfahrens zur Spektalkalibrierung der Bildspektren.

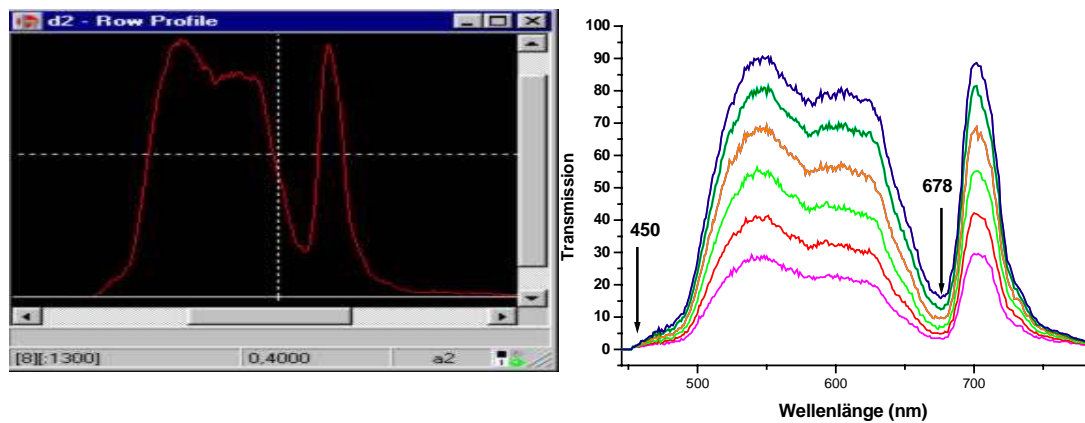


Abb.5.2.9: Zeileninspektor des kalibrierten Bildspektrums und die kalibrierten Transmissionsspektren von verschiedenen Punkten entlang der abgebildeten Linie eines Rizinus Blattes.

Radiometrische Kalibrierung

Bei der Aufnahme des Transmissionslichtes muß berücksichtigt werden, daß das Licht sowohl vom Objekt (Blatt) selbst als auch von allen optischen Bestandteilen (Objektive, Prisma, Kamerachip) des Spektrometersystems verändert wird. Die von der CCD-Kamera registrierte Lichtintensität wird sowohl durch die Kamerasensibilität als auch durch das Transmissionsvermögen der genannten optischen Teile bestimmt. Besonders beeinflusst die CCD-Kamera die radiometrische Veränderung der registrierten Strahlung, da der Kamerachip nicht bei allen Wellenlängen gleich sensitiv ist (Abb.5.2.10). Für eine korrekte Auswertung der Bildspektren müssen alle genannten Faktoren berücksichtigt werden und Bildspektren radiometrisch kalibriert werden. Um der Notwendigkeit der radiometrischen Bildkorrelation zu entgehen, wurde eine Normierung der Durchlaßstrahlung (Durchlaßlicht vom Blatt) auf die Beleuchtungsstrahlung (Referenzspektrum) für die Auswertung der Transmissionsbilder gemacht.

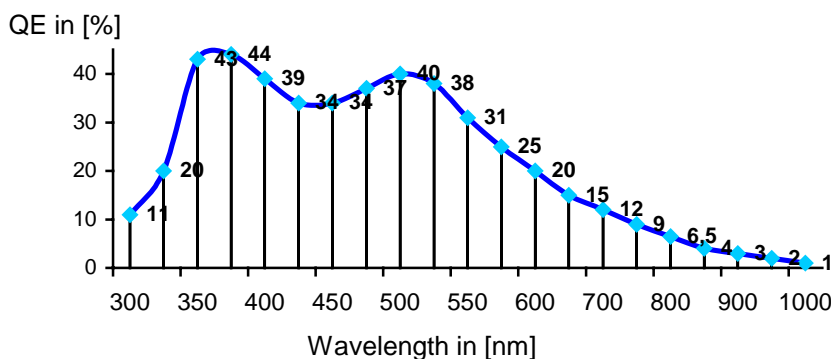


Abb.5.2.10: Spektrale Empfindlichkeit (quantum efficient) der Sensoren vom CCD-Chip der PixelFly Kamera (Eingabe vom Hersteller PCO, Kelheim, Deutschland).

Im Fall der Spektralmessungen ohne Normierung mit dem Referenzspektrum des Beleuchtungslichtes muß eine radiometrische Kalibrierung des Spektrometersystems durchgeführt werden. Durch die radiometrische Kalibrierung werden die gemessenen Grauwerte in spektrale Strahldichten umgewandelt. Eine Kalibration bezüglich der Signalintensität wird durch den Vergleich der Meßbildspektren mit den Bildspektren einer radiometrisch interkalibrierten Lampe (Normallampe) erreicht. Für die Auswertung der radiometrischen Funktion werden die gemessenen Bildspektren durch das radiometrisch geeichtete Bildspektrum des Halogenlichtes von der Ulbricht Kugel dividiert.

Fazit

Ein einzigartiges, robustes, sensibles, goniometrisches und ortsauflösendes 2D Spektrometer wurde auf der Basis eines Prismenmonochromators und einer CCD-Kamera konstruiert und aufgebaut. Es ist auch für Applikationen mit geringer Lichtleistung geeignet, das heißt für die Untersuchung der Transmission von dichten Objekten (Pflanzenblätter).

Mit dem goniometrischen Aufbau werden unterschiedliche experimentelle Versuchsaufbauten möglich. Neben den Transmissionsmessungen an Objekten können auch die Reflexionsmessungen unter verschiedenen Beleuchtungswinkeln durchgeführt werden.

Das CCD-Prismenspektrometer wurde für die anspruchsvollste Spektralanalyse an Pflanzenblättern entwickelt. Dieser abbildenden Spektrograph eignet sich insbesondere für Applikationen, die eine hohe örtliche und spektrale Auflösung erfordern.

RESULTATE

Kapitel 6

Bildgebende VIS-Spektroskopie von Pflanzenblättern Chlorophyllverteilung und -zustand

6.1. Spektralcharakteristiken von Photosynthesepigmenten

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist die räumlich hoch aufgelöste bildgebende Spektralmessung von Pflanzenblättern durchzuführen. Aus diesen Messungen kann sowohl die räumliche Verteilung von Chlorophyll und Wasser in Blättern bestimmt werden, als auch Aussagen über die verschiedenen Wasserzustände getroffen werden. Um diese spektrale Meßtechnik anwenden zu können, ist es unerlässlich, genaue Kenntnisse über die Spektralcharakteristiken der untersuchten Blätter zu gewinnen. In diesem Kapitel werden daher die Transmissionsspektren des VIS Bereiches von Mesophyten (Rizinus, Tabak) und Sukkulenten (Kalanchoe, Aloe) analysiert. Die Messungen wurden mit Hilfe der HP 8430 und SCAN 500 Spektrometer sowohl für die ganzen Blätter als auch für die aus ihnen gewonnenen Säfte und Extrakte der Photopigmente durchgeführt. Diese Spektraldaten von Blättern sind sowohl für die Bestimmung der Lage charakteristischer Absorptionsmaxima und -minima, als auch für die Abschätzung des Einflusses von Mehrfachlichtstreuung auf die gemessenen Absorptionsbanden erforderlich. Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben wurde, arbeitet das in dieser Arbeit entwickelte bildgebende spektroskopische Verfahren mit einer Auswahl von schmalbandigen Bandpassfiltern. Natürlich kann eine adäquate Auswahl dieser Filter nur getroffen werden, wenn die spektrale Kennlinie des Blattes exakt bekannt ist. Ebenfalls beinhalten Spektraldaten wichtige Informationen über die Interaktion der Absorption und Lichtstreuung n im Blatt und sind damit für ein tieferes Verständnis der Wechselprozesse von Licht mit der Blattstruktur und den Photosynthesepigmenten notwendig. Diese Prozesse äußern sich in den Spektralbildern der Blätter, die mit Hilfe der bildgebenden Spektroskopie gewonnen werden. Deshalb sind spektrale Voruntersuchungen des Blattes sehr wichtig für die Entwicklung von Verfahren bildgebender Spektroskopie am Pflanzenblatt und zwar sowohl für die Herstellung und Bearbeitung von Spektralbilder als auch für ihre Interpretation. Zum Beispiel wurde ein Verfahren für Extrahierung der "reinen" Absorptionsbanden von Photopigmenten und Wasser im Blattspektrum zuerst für die Analyse der konventionellen Extinktionsspektren entwickelt und approbiert. Danach wurde ähnliches Verfahren für die bildgebenden Spektroskopie modifiziert und verwendet. Die Methode der spektralen Bestimmung des Gehaltes von Photopigmenten und Wasser in Pflanzenblättern wurde ebenfalls zunächst bei der Bearbeitung der konventionellen Spektren entwickelt und wurde dann für die bildgebende Spektroskopie modifiziert. Es ermöglichte ein Übergang von der integrale spektrale Berechnung des Substanzgehaltes vom ganzen Blatt zur quantitative Bestimmung und Visualisierung ihrer räumlichen Verteilung am Blatt mittels der entwickelten Methoden bildgebender Spektroskopie.

6.1.1. Spektren der *in vitro* Chlorophylle in den Extrakten

Spektraluntersuchungen der Chlorophyllextrakte

Die Photosynthesepigmente der höheren Pflanzen bestehen aus den Chlorophyllen und einem Gemisch von Carotinoiden. Diese Substanzen sind in die Chloroplastenmembranen eingelagert, wo sie in nicht-covalenter Bindung an verschiedene Trägerproteine vorliegen. Die Chlorophyllextrakte aus frischem Pflanzenblattmaterial wurden nach der

standardisierten Methodik mit Hilfe von 80 % Ethanol gewonnen (Kapitel 4.1). Die Spektralmessungen an den Extrakten wurden mittels des HP Spektrometers im spektralen Wellenlängenbereich von 200-1100 nm durchgeführt. Abb.6.1.1 zeigt die Transmissionsspektren der Pigmenten-extrakte von Tabak und Rizinus Blättern. Im NIR Bereich (850-1100 nm) liegen die Banden der Schwingungsmoden der C-H und O-H Bindungen vom Ethanol und Wasser. Sie behindern die Analyse der Chlorophyllbanden nicht.

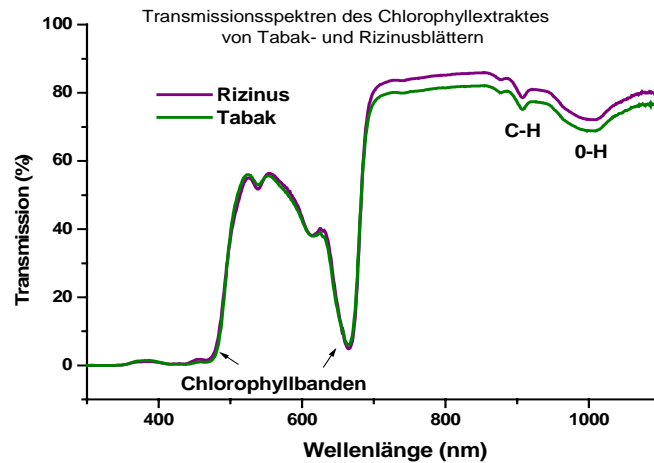


Abb.6.1.1: Transmissionsspektren des Photopigmentenextraktes von Tabak und Rizinus Blättern.

In Pigmentgemischen überlagern sich die Absorptionsspektren der einzelnen Komponenten additiv. Um die Beiträge der Spektralbanden der Photopigmente, anderer organischen Blattsubstanzen sowie des Lösungsmittels extrahieren, wurden die Spektren des Pigmentextraktes und des 80 % Ethanol getrennt registriert. Anschließend wurden ihre Spektren subtrahiert. In Abb.6.1.2 sind die registrierten Spektren und ermittelte Absorptionsbanden gezeigt. Ein Vergleich der Absorptionsbanden von Chlorophyll-extrakten der Tabak und Rizinus Blätter ist in Abb.6.1.3a dargestellt. Die abgetrennte Banden mit den Maxima bei 437 und 665 nm sind die Blau- und Rotbanden der Chlorophylle. Die kurzwelligen UV Elektronenbanden bei 330 nm entsprechen den organischen Blattsubstanzen. Wie aus Abb.6.1.3a ersichtlich ist, sind die Absorptionsspektren von Pigmentextrakten der Tabak und Rizinus Blätter sehr ähnlich. Dies beruht auf Tatsache, daß das Chlorophyll in dem Extrakt in seinem Molekular-zustand vorliegt.

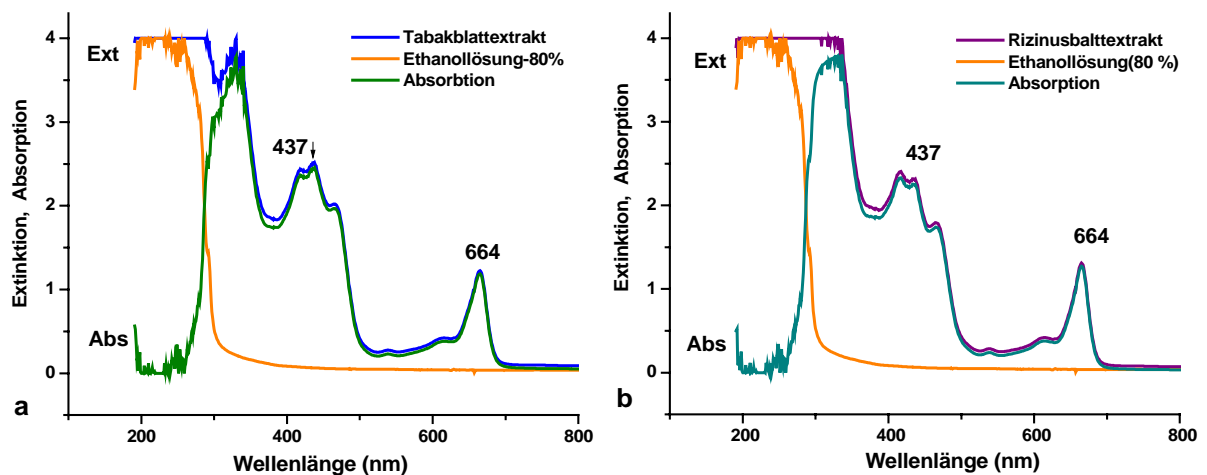


Abb.6.1.2: Extinktions- und Absorptionsspektren des Photopigmentextraktes eines Tabak(a), Rizinus Blattes (b) und der äthanolischen Extraktionslösung.

Zur Trennung von überlagerten Einzelbanden im Gesamtspektrum, welches die Absorptionsbanden der Photosynthesepigmente und organischer Substanzen enthält, wurde eine Dekonvolution des Spektrums durchgeführt. Dafür wurden die Spektren in den Gauß-Komponenten zerlegt. Das Ergebnis dieser Zerlegung ist in Abb.6.1.3b für die Chlorophyllbanden des Tabak Blattextraktes gezeigt. Wie aus den Fragmenten der Spektrumzerlegung in Abb.6.1.4a ersichtlich ist, liegen die rote Absorptionsmaxima der Chlorophylle a und b bei 667 und 651 nm. Dies wird aus der zweiten Ableitung des Spektrums der Rotbande noch verdeutlicht, wie der Abb.6.1.4b zu entnehmen ist.

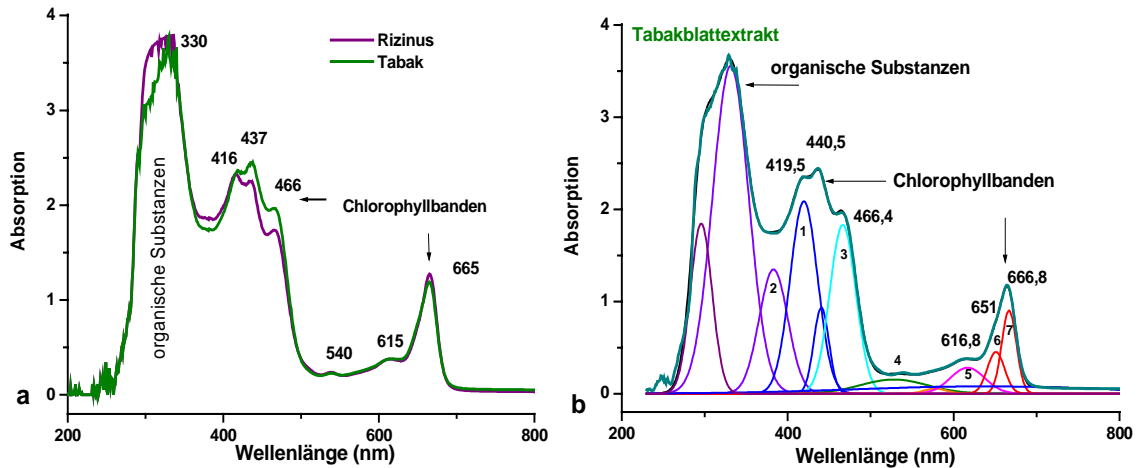


Abb.6.1.3: Absorptionsspektren des Extraktes eines Tabak und Rizinus Blattes (a). Dekonvolution der Absorptionsbanden des Tabakblattextraktes in Einzelbanden (b).

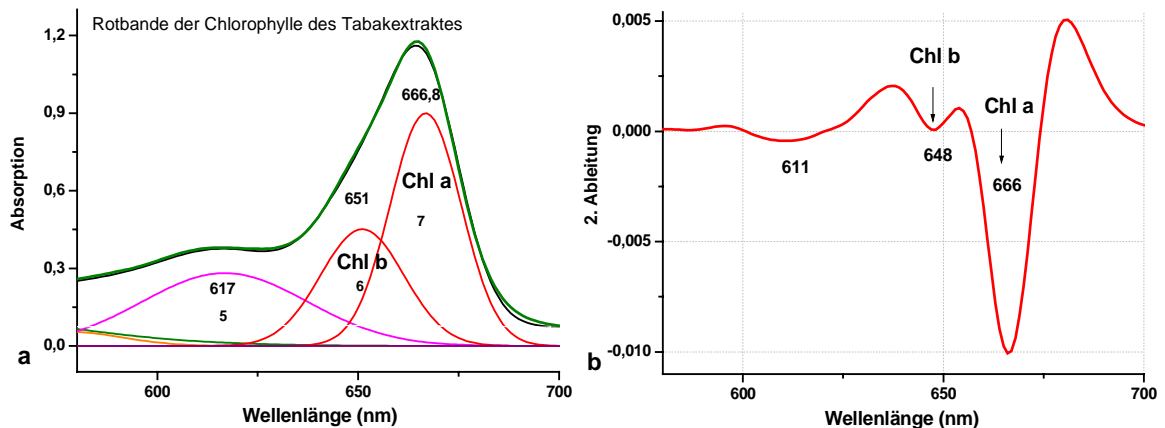


Abb.6.1.4: Dekonvolution der Rotbande in Einzelbanden der Chlorophylle a und b (a) und Spektrum der 2.Ableitung von der dieselben Chlorophyllbande (b) des Tabakblattextraktes.

Die intensiven Absorptionsbanden der *in vivo* Chlorophylle vom ganzen Pflanzenblatt konnten nicht so einfach registriert und analysiert werden, wie es für die Chlorophyllextrakte durchgeführt wurde. Dies ist bedingt durch die Blattgewebestruktur und den großen Gehalt an organischen Substanzen ebenso wie durch die Chlorophyll-Assoziation, weil Chlorophylle als Pigment-Protein-Komplexe in Chloroplasten vorkommen sind. Die UV Elektronen-banden der organischen Blattsubstanzen überlagern sich mit den Blaubanden der Chlorophylle. Deshalb muß man ihre Beiträge trennen. Die Chlorophyllbanden in Blattspektren konnten analog zu den Spektren von Chlorophyllextrakten getrennt werden. Es stellte sich heraus, daß die Kontur der hochfrequenten Banden in Extrakt-Spektren durch die Boltzmann-Kurve

$$y = (A_1 - A_2) / \{1 + \exp[(x - x_0)/d_x]\} + A_2$$

approximiert werden kann, wobei A_1 und A_2 aus der Regression an die Datenpunkte gewonnen werden. Für die Ermittlung der Parameter dieser Annäherung wurden einige Referenzpunkte im Spektralbereich von 340 bis 355 nm und bei 720 nm benutzt. In Abb.6.1.5a. sind die geschätzten Parameterwerte und die Anpassung der Bandenkontur für den Tabak Blattextrakt dargestellt

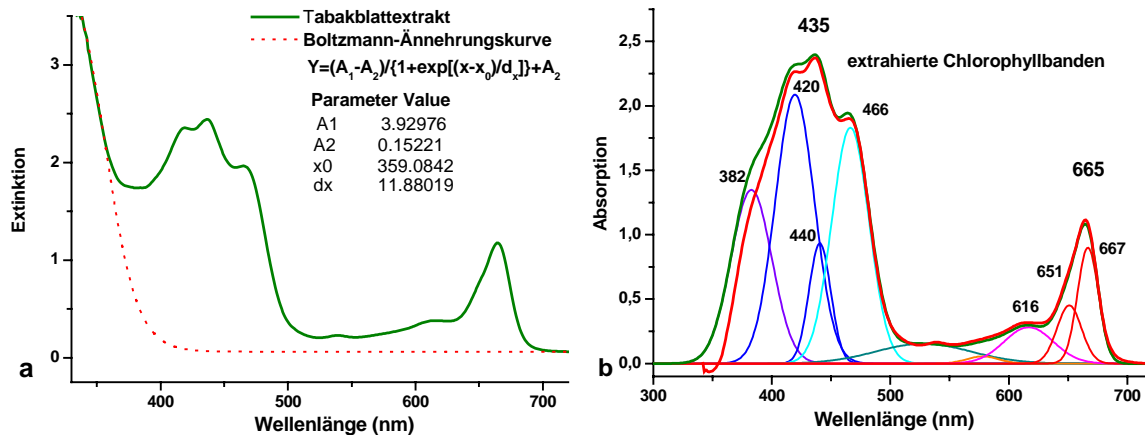


Abb.6.1.5: Extrahieren der Chlorophyll-Absorptionsbanden aus dem Extinktionsspektrum (a) und Dekonvolution extrahierten Chlorophyllbanden in Einzelbanden (b) für das Tabak Blattextrakt.

Die Subtraktion der hochfrequenten Bandenkontur aus dem Extinktionsspektrum des Extraktes ermöglicht die Ermittlung der Absorptionsspektren der Chlorophylle. Das auf diese Weise erhaltenen Spektrum des Pigmentextraktes vom Tabak Blatt ist als rote Kurve in Abb.6.1.5b dargestellt. Die grüne Kurve ist das Spektrum der Photosynthesepigmente, welches durch Addition der acht Einzelbanden ermittelt wurde. Die verwendete vier Einzelbanden sind die entsprechenden Banden der Spektrum-Dekonvolution (Abb.6.1.3b). Es zeigte sich, daß die auf diese zwei Arten ermittelten Pigmentspektren nahezu identisch sind. Diese Spektren-Identität zeigt, daß unser Verfahren für das Extrahieren der Absorptionsbanden ein konsistentes Ergebnis liefert. Die entwickelte Methodik für die Trennung der Chlorophyllbanden durch die Subtraktion der hochfrequenten Spektrumkontur ist einfach und für die Bearbeitung der experimentellen Daten gut geeignet. Deshalb wurde ähnliche Methodik auch für die Bearbeitung und Analyse der Absorptionsspektren von Pflanzenblättern und Blattsäften verwendet.

Spektraluntersuchungen der Blattsäfte

Die Absorptionsbanden der Photopigmente in den Spektren des Blattsaftes entsprechen der Chlorophylle, die in den Chloroplasten eingelagert sind. Die Blattsäfte enthalten außer Chloroplasten auch kleine Stücke der Blattgewebe, Zellaggregate und Zellbestandteile, die in Größe mit der IR-Wellenlänge vergleichbar sind. Deshalb weist der Blattsaft die größere Inhomogenität im Vergleich mit dem Pigmentenextrakt auf, in welchem die Chlorophylle in dem Molekularzustand vorliegen. In den Transmissionspektren der Säfte äußert sich auch der MLS-Einfluß. Die Spektren der Pflanzenblätter und ihrer Säfte wurden mittels des UV-VIS-NIR Zweistrahl-Spektrometers SCAN 500 mit ausreichend hoher Empfindlichkeit gemessen. Die Spektren der Blattsäfte wurden in einer 400 µm dicken Küvette registriert. Die Abb.6.1.6a zeigt in Übersichtsweise das Extinktionsspektrum des Tabak Blattsaftes im breiten Spektralbereich von 200 bis 2500 nm. Zum Vergleich ist dieser Abbildung auch das Absorptionsspektrum von destilliertem Wasser in der gleichen 400 µm dicken Küvette angegeben. Im Bereich des $\nu_{OH} + \nu_2$ Kombinationstones von Wasser bei 1970 nm ist das Spektrum des Saftes dem Wasserspektrum ähnlich. Im kurzwelligen Bereich nimmt der Extinktionsuntergrund zu, auf dem sich die Absorptionsbanden der Chlorophylle herausheben. Die Zunahme des MLS-Einflusses kann auch mit der Abnahme der Wellenlänge erklärt werden. Eine

weitere Erklärung für die Steigerung des Extinktionuntergrundes im Bereich 300-1000 nm liefert der Beitrag der Elektronenbande von Wasser [Korniyenko 2002] und organischen Stoffe im Blatt.

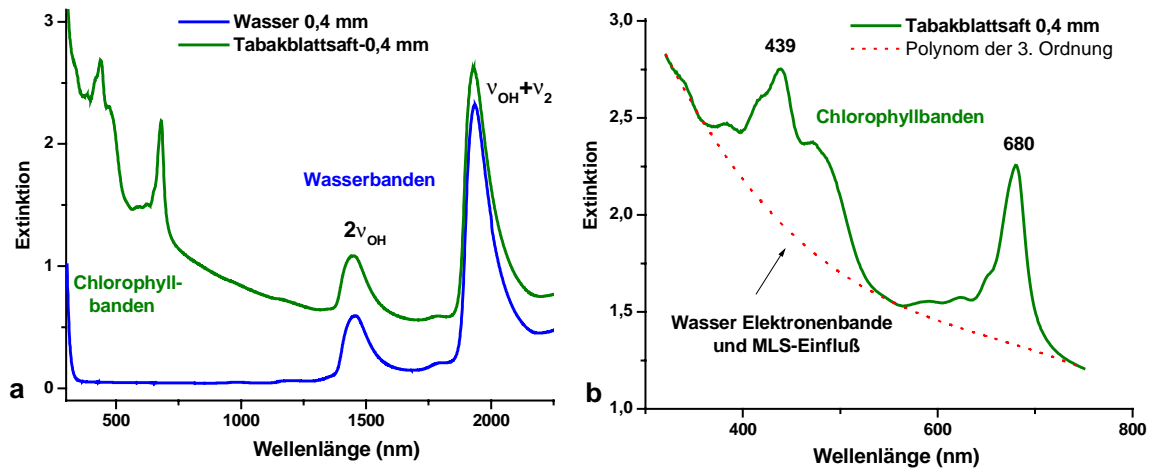


Abb. 6.1.6: Extinktionsspektren vom Tabak Blattsaft und destilliertem Wasser (a). Extrahieren der Absorptionsbanden aus dem Spektrum des Tabak Blattsaftes (b).

Die Extraktion der Absorptionsbanden von Photopigmenten im Spektrum des Tabak Blattsaftes wird in Abb.6.1.6b präsentiert. Die Basislinie der UV Elektronenbanden und MLS wurde durch ein Polynom 3. Ordnung approximiert. Dafür wurden vier Referenzpunkte zwischen den Absorptionsbanden ausgewählt. Die Dekonvolution der extrahierten Blau- und Rotbanden in Einzelkomponenten ist in Abb.6.1.7a dargestellt.

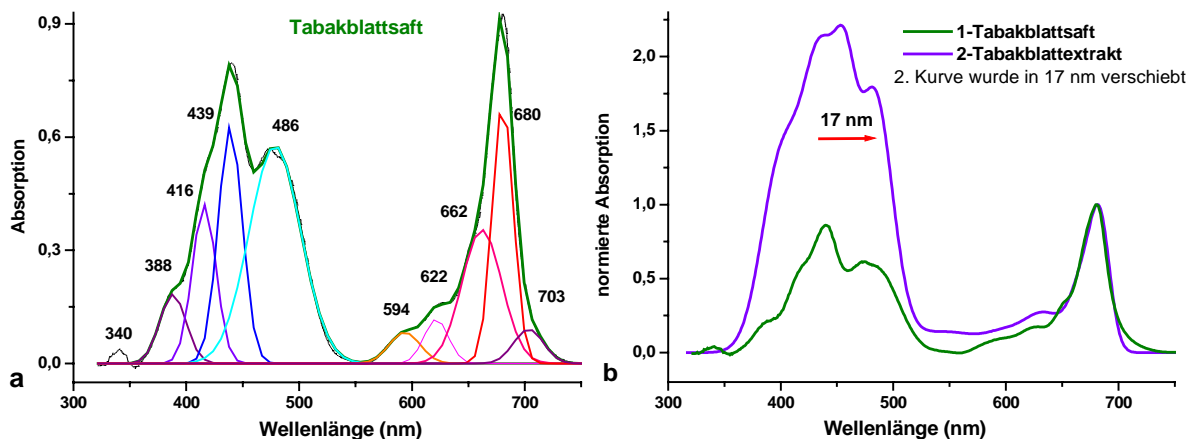


Abb. 6.1.7: Extrahierte Absorptionsbanden des Tabak Blattsaftes und ihre Dekonvolution in Einzelbanden (a). Vergleich der Chlorophyllbanden des Extraktes und Saftes von Tabak Blatt (b).

Es zeigte sich, daß sich die Chlorophyllbanden in den Spektren der Blattsäfte von denen der Chlorophyllextrakte durch eine Rotverschiebung unterscheiden. Dabei verschiebt sich das Maximum der Rotbande um ca. 17 nm (von 664 bis 681 nm) und das Blaumaximum um ca. 20 nm (von 466 bis 486 nm). Dies entspricht einer Verschiebung der energetischen Chlorophyllzustände zum niedrigen Frequenzbereich in 376 und 877 cm^{-1} . Diese Energiesenkung der Chlorophylle in Chloroplasten wird durch die Assoziation der Chlorophyllmoleküle in den Chloroplasten und durch ihre Pigment-Protein-Komplexe in den Thylakoidmembranen verursacht. Da die *in-vivo*-Chlorophylle in Chloroplasten und *in-vitro*-Chlorophylle im Extrakt chemisch gesehen dasselbe sind, liegt der Schluß nahe, daß die Chlorophylle *in vivo* nicht im monomolekularen Zustand vorkommen, sondern sich in einem komplexen Zustand befinden. Die Natur dieses Komplexes kann entweder ein Chlorophyll-Chlorophyll-Komplexe oder Aggregate sein, ein Chlorophyll-

Hilfspigmente-Komplexe und ein Chlorophyll-(Lipo)protein-Komplexe oder ein Kombination von diesen.

Abbildung 6.1.7b. zeigt ein Vergleich der Chlorophyllspektren des Extraktes und des Saftes vom Tabak Blatt. Dabei wurde die Kurve des Spektrums vom Chlorophyllextrakt in 17 nm zum langwelligen Spektrumbereich verschoben, um die Maxima beider Rotbanden zur Deckung zu bringen. Wegen unterschiedlichen Bedingungen während der Spektromaufnahmen (Dicke der Küvette 1 cm und 400 μm) wurde eine Normierung der Spektren auf den Maximum der Rotbande vom Chlorophyll gemacht. Die Spektren des Blattsaftes und Extraktes unterscheiden sich nicht nur durch ihre Frequenzverschiebung, sondern vor allem durch die Intensität der Blaubande. Betrachtet man Abb.6.1.7b, so sieht man, daß die Blaubande (440 nm) vom Blattsaft (Chlorophylle in Chloroplasten) gegenüber der Bande vom Pigmentextrakt (freie Chlorophyllmoleküle) stark reduziert ist. Dabei ist ihre Intensität niedriger als die der Rotbande bei 680 nm. Die Bandenintensität reagiert sehr empfindlich auf den Molekularwechselwirkungen, sowie auf Assoziation der Moleküle. Dies wird durch die Umstellung der Elektronenzustände verursacht. Die Veränderung der Bandenintensität vom Chlorophyll könnte als ein Merkmal der Assoziation von Molekülen sowie als eine Erscheinungsform ihrer kollektiven Eigenschaften dienen.

6.1.2. Spektren der *in vivo* Chlorophylle in Pflanzenblättern

VIS Spektren der mesophyten Pflanzenblätter

In der lebenden Zelle zeigen die *in vivo* Chlorophylle andere Spektraleigenschaften in Vergleich zu dem Pigmentenextrakt. Das Absorptionsspektrum unterscheidet sich von dem des gelösten Chlorophylls. Ersten ist die Lage der *in-vivo*-Maxima hin zu längeren Wellenlängen verschoben und zweitens verändert sich die Form des Spektrums. Das Chlorophyll ist im *in-vivo*-Zustand von Hilfspigmenten begleitet. Ihre Absorption überlappt die Blaubande des Chlorophylls. Natürlich sind die Blattspektren auch stark von der MLS beeinflusst, die Chlorophyllbanden liegen auf dem hohen Extinktionsuntergrund (Abb.6.1.8a).

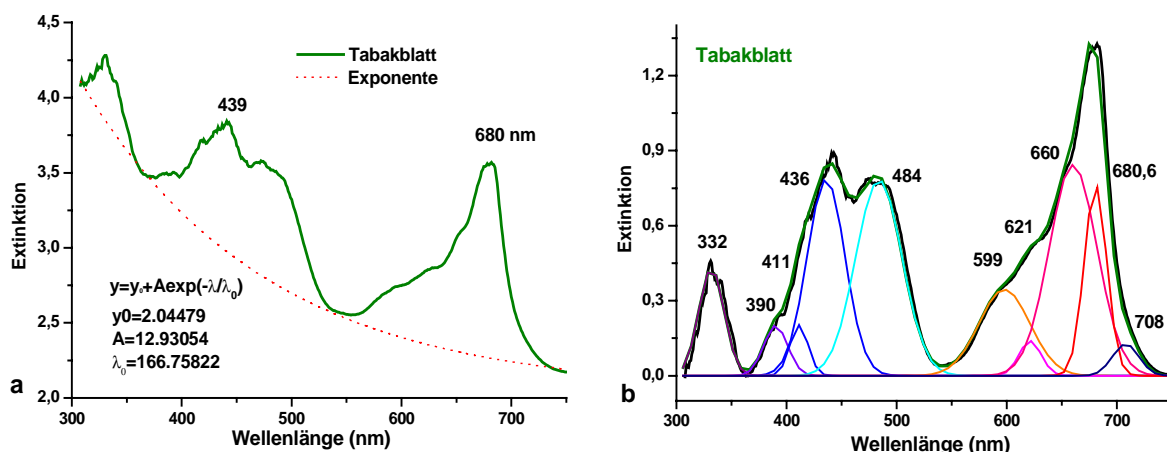


Abb. 6.1.8: Extinktionsspektrum eines Tabak Blattes und Exponentialkurve des Untergrundes (a). Extrahierte Chlorophyll-Absorptionsbanden und ihre Dekonvolution in Einzelbanden (b).

Die in dieser Arbeit entwickelte Methodik für die Extraktion der Absorptionsbanden von Blattpigmenten wurde auch für die Bearbeitung der Spektren von Pflanzenblättern verwendet. Die Transmissionsspektren der Pflanzenblätter wurden ebenfalls mit Hilfe des Spektrometers SCAN 500 im breiten Spektralbereich von 200 bis 1000 nm registriert. Die breite Verteilung in Blattspektren stellt einen unerwünschten Untergrund dar. Abbildung 6.1.8a zeigt das Extrahieren der Chlorophyllbanden im Extinktionsspektrum

des Tabak Blattes. Dabei wurde die Konturlinie der Beiträge von UV Elektronenbanden und MLS-Untergrund durch eine Exponentialkurve approximiert. Ihre Parameter sind in Abb.6.1.8a angegeben. Die extrahierten Absorptionsbanden wurden in den Einzelbanden zerlegt (Abb.6.1.8b). Dekonvolution des Spektrums in einzelne Banden deutet auf mehrere Chlorophyll-Formen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima hin (Abb.6.1.8b). Die unterschiedliche Absorption der Chlorophyllformen beruht auf Chlorophyll-Lipid-Interaktionen oder auf Chlorophyll-Protein-Bindungskombinationen. Es zeigte sich, daß die Chlorophyllbanden von Pflanzenblättern den Spektren der Blattsäfte sehr ähnlich sind. Dies wird durch dieselben Chlorophyll-Zustände in den Pigment-Protein-Komplexen der Chloroplasten bedingt, die in den Säften analog zu den Blättern unbeschädigt Vorhanden sind.

Eine Vergleichsanalyse der Chlorophyll-Absorptionsbanden für junge, reife und alte Tabak Blätter wurde durchgeführt. Extrahieren der Chlorophyllbanden vom Untergrund des Extinktionsspektrums zeigt Abb.6.1.9a. Wie es aus dieser Abbildung ersichtlich wird, ist das Niveau des Extinktionsuntergrundes in den reifen Blättern am höchsten, was durch die große Interzellularen-Anzahl und die dadurch gesteigerte MLS erklärt werden könnte. Abbildung 6.1.9b gibt ein Vergleich der Chlorophyll-Absorptionsbanden für die Tabak Blätter in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. In den jungen und reifen Blättern ist das Maximum der Rotbanden bei 680 nm nahezu identisch, aber die Blaubande bei 439 nm ist in den jungen Blättern intensiver. Dies weist auf geringe kollektive Eigenschaften des Chlorophyllsystems in den jungen Blättern hin. Im Gegenteil ist die Blaubande der alten Tabak Blätter stark reduziert, was auf die hohe Stufe der Chlorophyll-Assoziation hinweist.

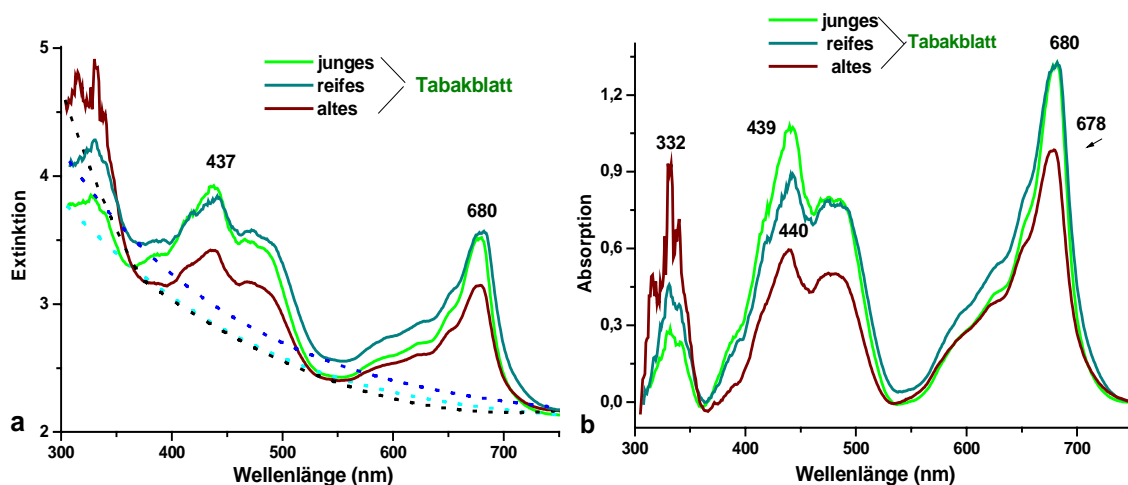


Abb.6.1.9: Extinktionsspektren für junges, reifes und altes Tabak Blatt und Exponentialkurve des Untergrundes (a). Extrahierte Absorptionsbanden des *in vivo* Chlorophylls eines Tabak Blattes (b).

Um zu prüfen, inwieweit die MLS das Absorptionsvermögen der Chlorophylle in den Pflanzenblättern beeinflusst, wurden die Veränderungen der Absorptionsbanden für die wasserinfiltrierten Blätter analysiert. Weil die MLS im Blatt dadurch verursacht wird, daß Lichtstrahlen an den Grenzen zwischen Interzellularräumen und Zellwand aufgrund ihrer unterschiedlichen optischen Dichten gebrochen werden. Sind die Interzellularen Räume mit Wasser gefüllt, so erscheint das Blatt dagegen viel durchsichtiger.

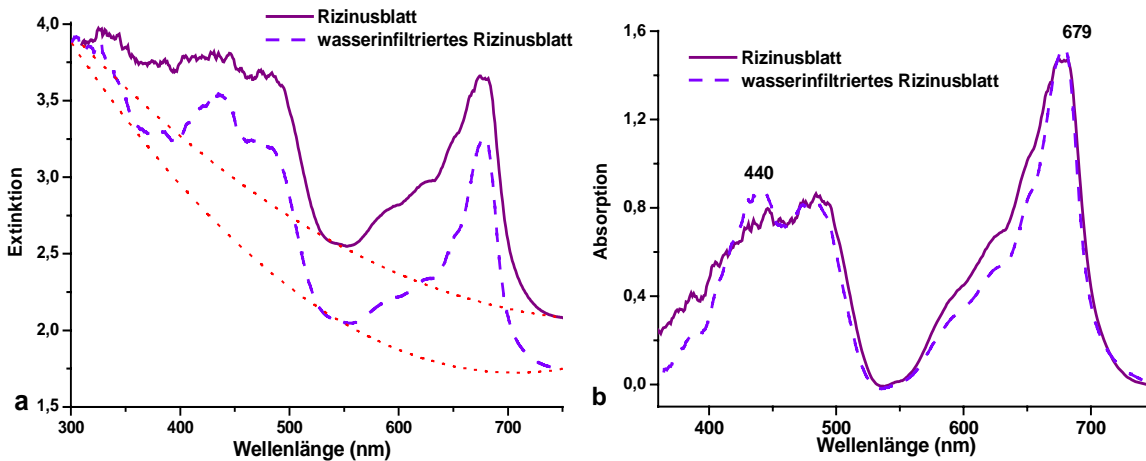


Abb.6.1.10: Extinktionsspektren und Approximationskurven des Untergrundes (a), extrahierten Chlorophyllbanden (b) eines wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten Rizinus Blattes.

Daher können die Absorptionsspektren für die wasserinfiltrierten Blätter viel genauer bestimmt werden. Die Analyse der Blattspektren zeigte, daß durch die Wasserinfiltration der Blätter der MLS-Einfluß stark reduziert und der Extinktionsuntergrund sinkt. Dabei ist die Verteilung des MLS-Untergrundes im Spektrum der Tabak Blätter fast monoton und erreicht 20-40 % des gesamten Extinktionsmoduls. Wiederum wurden die Chlorophyllbanden aus dem Untergrund des Extinktionsspektrums für verschiedene Blätter extrahiert. Sie sind in Abb.6.1.10 - 6.1.12 dargestellt.

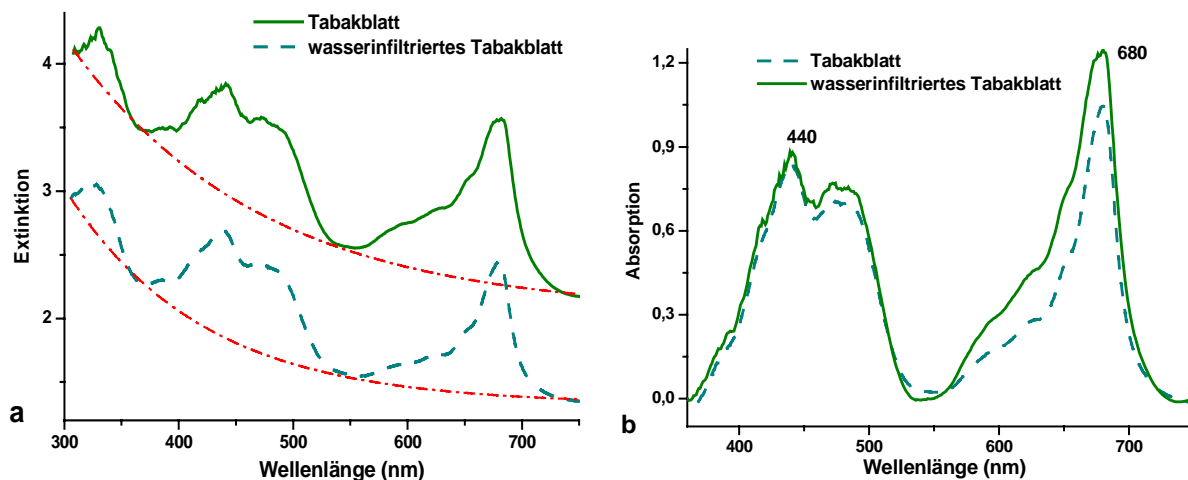


Abb.6.1.11: Extinktionsspektren und Approximationskurven des Untergrundes (a), die extrahierten Chlorophyllbanden (b) des wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten Tabak Blattes.

Auf diese Weise können die Beiträge der MLS und UV Elektronenbanden getrennt werden. Es zeigte sich, daß der Beitrag der UV Elektronenbanden in den Extinktionsuntergrund dominiert und zum kurzwelligen Bereich ansteigt. Die Veränderungen der Chlorophyllbanden der Blätter bei der Infiltration mit Wasser sind in Abb.6.1.10b, 6.1.11b und 6.1.12b gezeigt. Die Intensität der Rotbande ist in den wasserinfiltrierten Tabak Blättern gegenüber den nichtinfiltrierten Blättern reduziert. Dies spiegelt den MLS-Einfluß auf die Absorptionsbanden wieder. Die verkürzten Lichtwege im wasserinfiltrierten Blattgewebe führen zu einer Senkung der Lichtabsorption. Die Veränderungen der Blaubande der Pigmente in den wasserinfiltrierten Blättern sind gering.

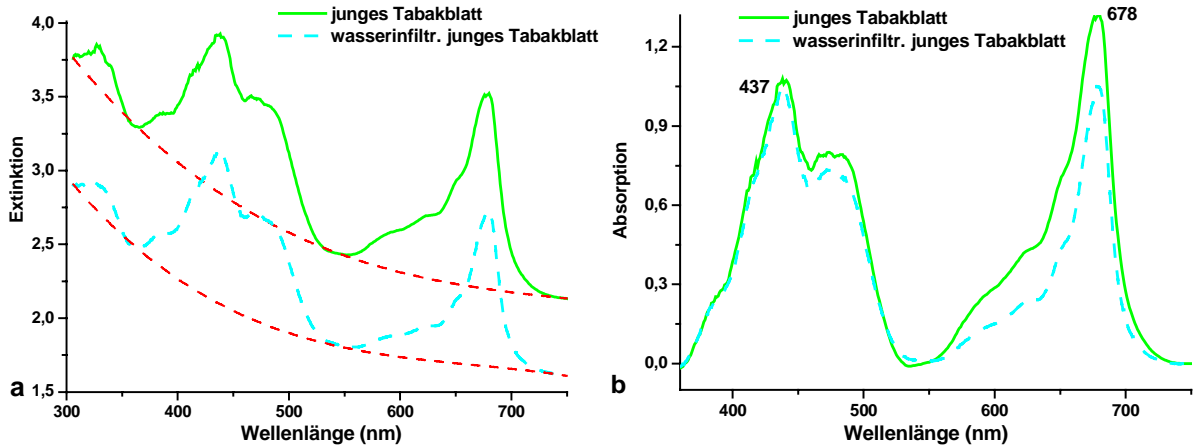


Abb. 6.1.12: Extinktionsspektren und Approximationskurven des Untergrundes (a), extrahierte Chlorophyllbanden (b) eines wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten jungen Tabak Blattes.

Mittels der extrahierten Absorptionsbanden der Chlorophylle lassen sich die Koeffizienten (K) der Absorptionsverstärkung, welche durch den MLS-Einfluß im Blattgewebe verursacht wird, berechnen. Dafür wurden die Verhältnisse der Spektren aus nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Blätter ausgewertet. Abb.6.1.13 zeigt die ermittelten spektralen Kurven der Verstärkungskoeffizienten.

Die größte Werte $K \sim 1,8 - 3$ entsprechen der Bandenflanke. Für das junge Tabakblatt ist der MLS-Einfluß auf die Absorptionsbanden etwas geringer als bei den reifen und alten Blättern. Dies könnte durch die kleinere Anzahl der Interzellularen und durch die kompakte Gewebestruktur der jungen Blätter erklärt werden. Für den Maxima der Rotbanden bei 680 nm ist der Verstärkungskoeffizienten am geringsten. Im Bereich der Blaubanden konnte der MLS-Einfluß kaum gemessen werden.

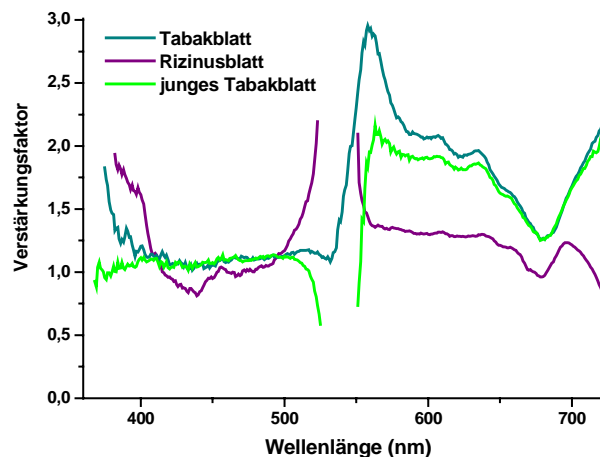


Abb. 6.1.13: Absorption-Verstärkungsfaktor (K) wurde als Verhältnis der Spektren von wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten Blättern ermittelt.

VIS Spektren der sukkulenten Pflanzenblätter

Die Spektraluntersuchung der dicken wassergesättigten sukkulenten Blätter (Aloe, Kalanchoe) ist ungleich schwieriger im Vergleich zu den dünnen mesophyten Blättern (Rizinus, Tabak). Die genauesten Ergebnisse konnten für das Mesophyllgewebe der Aloe Blätter nach dem Entfernen der Cuticula und des oberen Blattgewebes, die große Pigmentmenge enthalten, erreicht werden. Das somit untersuchte Blattgewebe der Aloe hatte eine durchsichtige Struktur mit einem geringeren Pigmentgehalt.

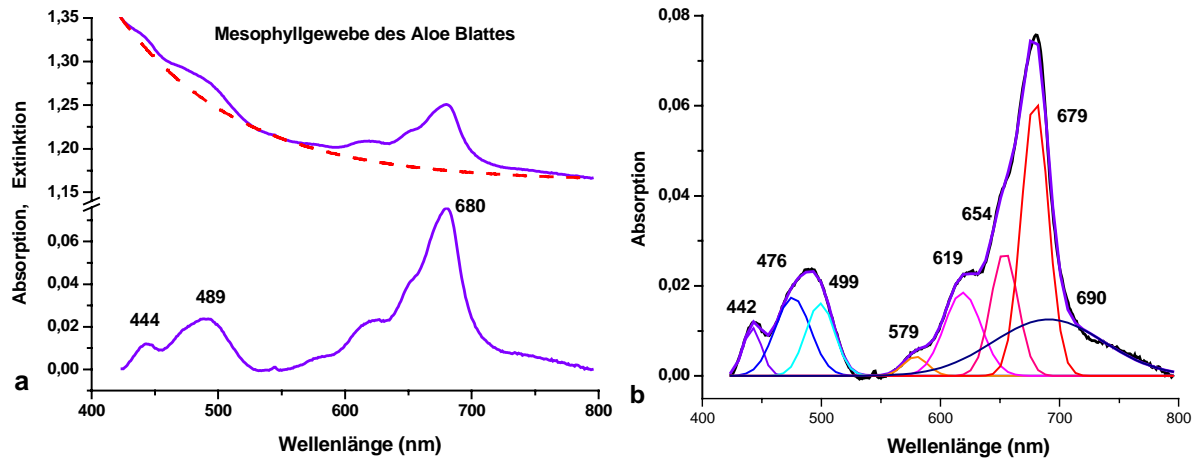
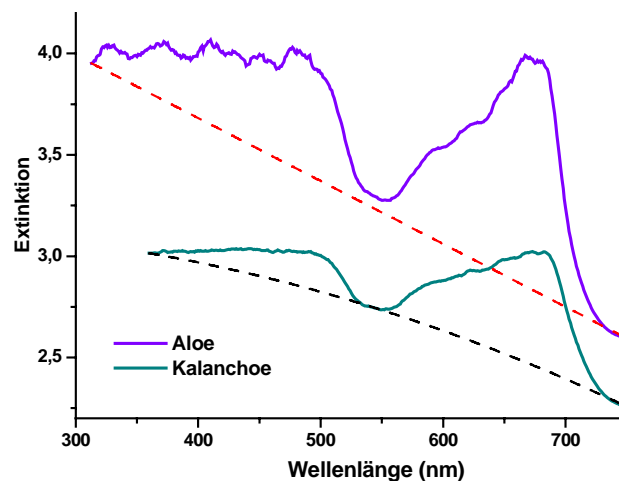


Abb.6.1.14: Extrahieren der Chlorophyll-Absorptionsbanden aus den Extinktionsspektren (a) und ihre Dekonvolution in Einzelbanden (b) für Mesophyllgewebe eines Aloe Blattes.

Extrahierten Absorptionsbanden des Mesophyllgewebes von Aloe sind in Abb.6.1.14a und ihre Dekonvolution in Einzelbanden in Abb.6.1.14b dargestellt. Im Spektrum des Aloe Blattes wird Intensität der Rotbande bei 680 nm gegenüber der Blaubande bei 440 nm erhöht.

Abb.6.1.15:

Extraktion der Chlorophyll Absorptionsbanden aus Extinktionsspektren der sukkulenten Aloe und Kalanchoe Blätter.



Der Beitrag der Lichtstreuung und -absorption in den Spektren des ganzen sukkulenten Blattes ist ungleich komplizierter als in den Spektren des isolierten Gewebes. Dies reduziert die Genauigkeit der gemessenen spektralen Verteilung der extrahierten Chlorophyllbanden (Abb.6.1.15). Ein Vergleich der Spektren für untersuchten mesophyten und sukkulenten Blätter zeigt Abb.6.1.16a.

Die Rotbande der Rizinus und Tabak Blätter hat die stärkste Intensität, was auf die hohe Chlorophyllkonzentration deutet. Die Blaubanden sind für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in den Pflanzenblättern wegen der starken Abhängigkeit ihrer Intensität von dem Assoziations-Grad der Chlorophyllmoleküle weniger geeignet. In Abb.6.1.16b sind die normierten Rotbanden der Chlorophylle von untersuchten Blättern zusammen aufgetragen. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, ist für Rizinus und Aloe die Breitenzunahme des Bandenmaximums im Vergleich zu dem Tabak Blatt charakteristisch. Bei Kalanchoe fällt die Asymmetrie und die Rotverschiebung der Absorptionsbanden auf. Dies könnte auf die kollektiven Eigenschaften der Chlorophylle hindeuten.

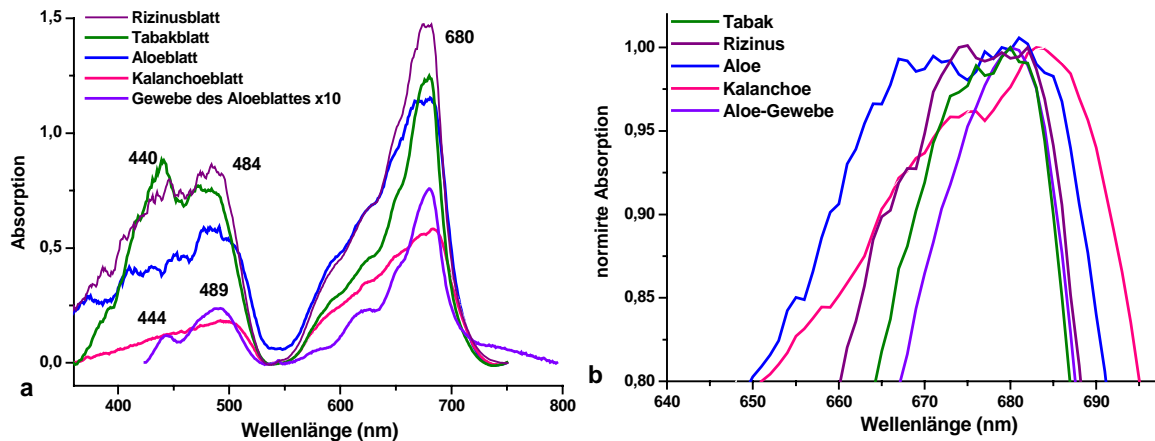


Abb. 6.1.16: Vergleich der Chlorophyllbanden (a) und der Rotbanden der Chlorophylle (b) von mesophyten und sukkulenten Pflanzenblättern.

Die Hauptpigmente in den Pflanzenblättern sind Chlorophyll *a* und *b*. Die Blaubande vom Chlorophyll *a* der untersuchten Blätter hat das Maximum bei 440 nm und Rotbande bei 680 nm. Die Maxima bei 460 und 650 nm der Elektronenbanden des Chlorophylls *b* sind zwischen den Banden des Chlorophylls *a* angeordnet. Die Elektronenbanden der begleitenden Carotinoide-Pigmente liegen laut den Literaturdaten bei 420-480 nm und sie überlagern sich mit der Absorptionsbanden der Chlorophylle. Dies sollte bei den vollständigen spektroskopischen Blattuntersuchungen auch berücksichtigt werden. In unserem Fall der Entwicklung des Verfahrens der bildgebenden Spektroskopie von Pflanzenblättern könnte dieses vernachlässigt werden. Das Verfahren zur Visualisierung der Chlorophyllverteilung wurde für das Spektralbereich der Rotbande bei 680 nm entwickelt. Die Rotbande der Chlorophylle wird mit den Banden der Carotinoide nicht überlagert und könnte mit Hilfe der geeigneten Bandpaßfilter aus gesamten Lichtspektrum des Blattes ausfiltriert werden.

Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methodik für das Extrahieren der Absorptionsbanden in Extinktionsspektren der Pflanzenblätter aus dem Untergrund der MLS und der UV-Elektronenbanden von organischen Substanzen und Wasser entwickelt.

Die starke Veränderung im Absorptionsspektrum der Chlorophylle wurde bei dem Übergang des Chlorophyllzustandes von einzelnen Molekülen in Extrakte zu der Assoziationsform in Blättern beobachtet. Diese Veränderung wurde durch die rote Bandverschiebung und die Intensitätserniedrigung der Blaubande ersichtlich.

Die Spektralanalyse der wasserinfiltrierten Blätter hat gezeigt, daß der MLS-Beitrag in Extinktionswerte im Bereich der Chlorophyllbanden kaum von der Wellenlänge abhängt. Der Extinktionsbeitrag der UV Elektronenbanden der organischen Substanzen steigt zum kurzwelligen Spektrumbereich hin an und wirkt dominierend. In Blattspektren nimmt die Intensität der Absorptionsbanden der Chlorophylle infolge des MLS- Einflusses stark zu. Der Verstärkungsfaktor ansteigt von 1,3 im Maximum der Rotbande und an der Bandenflanke bis zu 1,8-3 für Tabak Blätter.

Die Blaubanden sind für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in den Pflanzenblättern nicht geeignet. Dies wird durch ihrer Überlagerung mit den Absorptionsbanden der Carotinoide und durch der starken Abhängigkeit ihrer Intensität von dem Assoziations-Grad der Chlorophyllmoleküle bedingt. Deshalb sollte die spektrale Bestimmung des Pigmentgehaltes in den Pflanzenblättern im Bereich der Rotbande durchführen werden. Diese wurde bei der Ausarbeitung der Methode bildgebender Spektroskopie für die Visualisierung des Chlorophylls an Pflanzenblättern berücksichtigt.

6.2. Goniometrische Spektraluntersuchungen der Pflanzenblätter

Im Unterschied zu konventionellen Spektrometern ermöglicht das von uns entwickelte Schema des goniometrischen bildgebenden 2D CCD-Spektrometers die Untersuchungen der Reflexions- und Transmissionscharakteristiken der Pflanzenblätter bei verschiedenen Anordnungen des untersuchten Blattes, der Beleuchtungsquelle und der CCD-Kamera durchzuführen. In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der spektralen Untersuchungen von Tabak und Rizinus Blättern bei verschiedenen Beleuchtungs- und Aufnahmewinkeln dargelegt. Der Aufnahmewinkel ist gleichbedeutend dem Streuwinkel des vom Blatt ausgehenden Lichtes. Dieses gestreute Licht wurde als Spektralsignatur (Bildspektrum) vom CCD-Spektrometer registriert. Damit konnte spektrale Streu- und Absorptionscharakteristika des Blattes untersucht werden. Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist, daß die großen Sequenzen der Bildspektren mittels Bildverarbeitung zu gesamte optisch-spektrale Charakteristiken der Pflanzenblätter zusammengefaßt werden können.

6.2.1. Goniometrische Spektralmessungen an Blättern

Mit dem goniometrischen CCD-Spektrometer wurde es möglich, die Strahlung unter allen Winkeln der horizontalen Ebene mit der Ausnahme von ± 30 Grad unweit der Beleuchtungsquelle zu registrieren (Kapitel 5.3). Für verschiedene Streuwinkel wurden die Bildspektren (2D-Spektren) des Blattgewebes aufgenommen, das entlang einer Linie (von ca. 40 mm Länge) mittels der Spektrometerspalte ausgewählt wurde. Für verschiedenen Punkte auf dieser Blattlinie wurden die spektrale Indikatoren untersucht. Die Streuung-Indikatoren wurden beim senkrechten und schrägen Lichteinfall auf das Blattoberfläche studiert. Wegen der oben-unten Asymmetrie der dorsiventralen Blätter wurden die Spektren sowohl für den Lichteinfall auf die Ober- als auch auf die Unterseite des Blattes untersucht.

Der senkrechte Lichteinfall ($\theta=0^\circ$) auf das Blatt

Abbildung 6.2.1 zeigt Spektren des reflektierten und transmittierten Lichtes bei senkrechten Einfall der Strahlung einer Xenonlampe auf die Unterseite des Tabak Blattes ($\theta=0^\circ$) und bei verschiedenem Aufnahmewinkel φ für das Streulicht. Der Winkel φ wurde bei der Aufnahme der Reflexionsspektren von 30 bis zu 90 Grad variiert, und bei den Transmissionspektren von 100 bis zu 180 Grad.

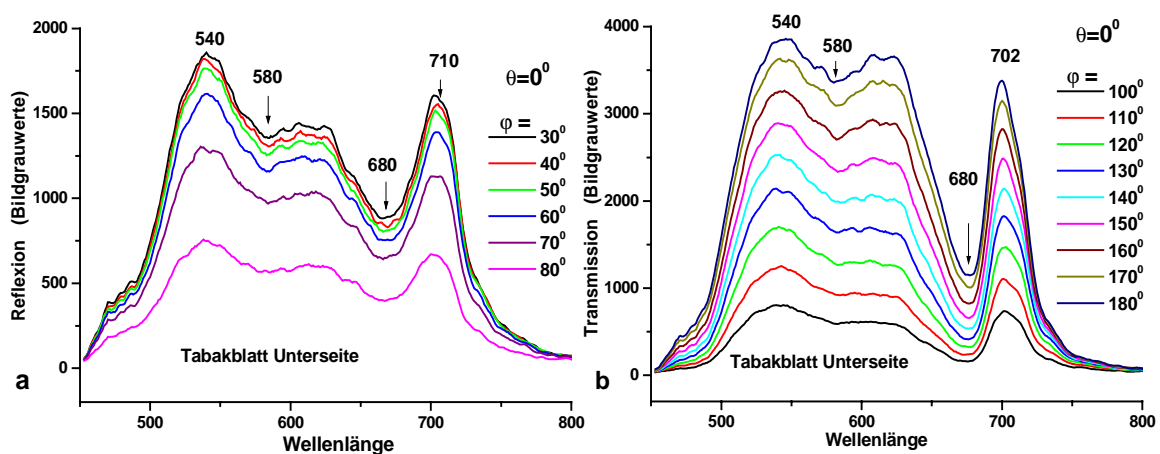


Abb. 6.2.1: Goniometrische Reflexion-(a) und Transmissionspektren (b) bei der senkrechten Beleuchtung der Unterseite eines Tabak Blattes und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ .

In diesen Spektren ist eine Intensitätssenkung im Bereich der blauen und roten Absorptionsbanden des Chlorophylls zu beobachten. Eine vollständige Beobachtung der Form der blauen Absorptionsbande wird durch die verminderte Sensibilität der verwendeten Kamera im Bereich 430-450 nm beeinträchtigt. Die maximale Strahlungsintensität ist bei 540 nm zwischen den Absorptionsbanden der Photopigmente zu sehen. Im Transmissionsspektrum wächst die Strahlungsintensität mit der Abnahme des Lichtstreuungswinkels mehr gleichmäßiger im Vergleich zum Reflexionsspektrum. Wie später noch gezeigt wird, hängt dies mit der großen Indikatixbreite der reflektierten Strahlung zusammen. Ähnliche spektrale Gesetzmäßigkeiten wurden auch im Rizinus Blatt beobachtet. Die Transmissions- und Reflexionsspektren bei der Beleuchtung der Unter- und Oberseiten des Rizinus Blattes sind in Abb.6.2.2 und 6.2.3 gezeigt.

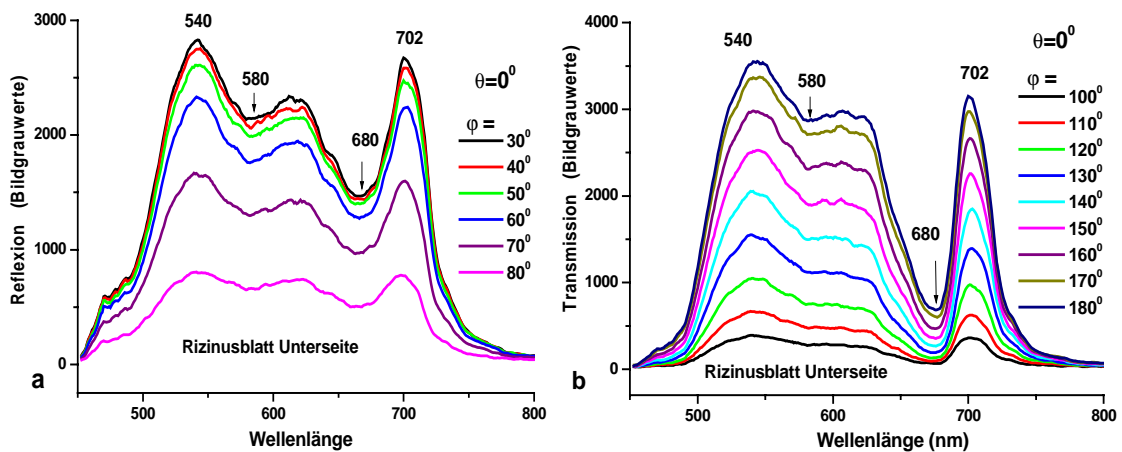


Abb. 6.2.2: Goniometrische Reflexion-(a) und Transmissionsspektren (b) bei der senkrechten Beleuchtung ($\theta=0^\circ$) der Unterseite eines Rizinus Blattes und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ

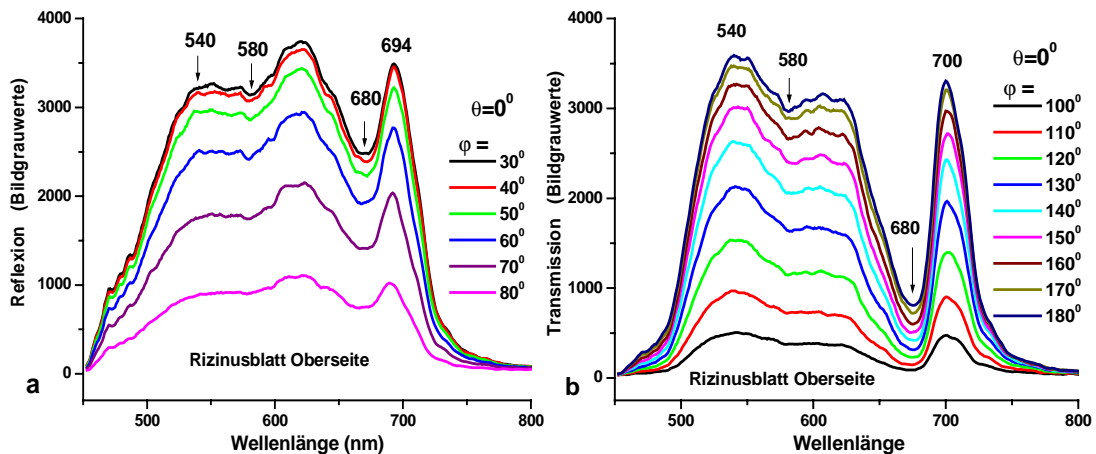


Abb. 6.2.3: Goniometrische Reflexion-(a) und Transmissionsspektren (b) bei der senkrechten Beleuchtung ($\theta=0^\circ$) der Oberseite eines Rizinus Blattes und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ

Für das Reflexionsspektrum der Oberseite des Rizinus Blattes ist eine Reduzierung der Absorptionsbanden der Photopigmente charakteristisch. Wahrscheinlich wegen einer dickeren Cuticula und der dichteren Verpackung der Palisadenparenchymzellen entsteht die reflektierte Strahlung in der feineren oberflächlichen Schicht im Vergleich zu dem Unterseite Teil des Blattes .

Der schräge Lichteinfall ($\theta=60^\circ$) auf das Blatt

Die Reflexions- und Transmissionsspektren beim schrägen Lichteinfall auf Rizinus und Tabak Blätter sind in Abb.6.2.4 und Abb.6.2.5 gezeigt. In diesem Fall änderte sich der Aufnahmewinkel für die Streustrahlung von -30 bis zu 90 Grad für die Reflexionsspektren, und von 100 bis zu 270 Grad für die Transmissionsspektren. Bei einem schrägen Einfall der Strahlung gibt es keine Symmetrieachse der Streuindikatrix, deshalb wurde die gestreute Strahlung im maximal möglichen Bereich von -30 bis zu 270 Grad registriert.

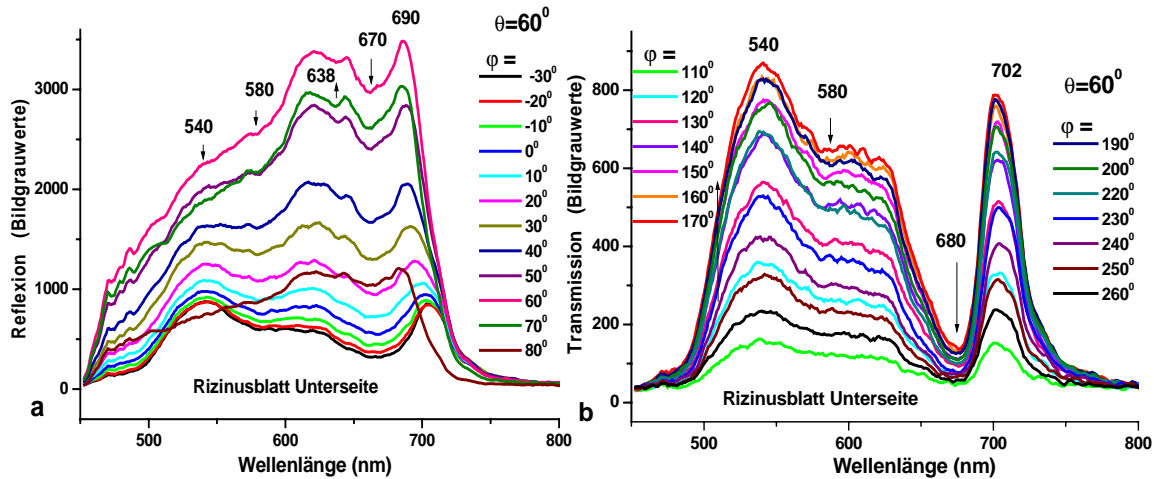


Abb. 6.2.4: Goniometrische Reflexion-(a) und Transmissionsspektren (b) bei schräger Beleuchtung ($\theta=60^\circ$) der Unterseite eines Rizinus Blattes und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ

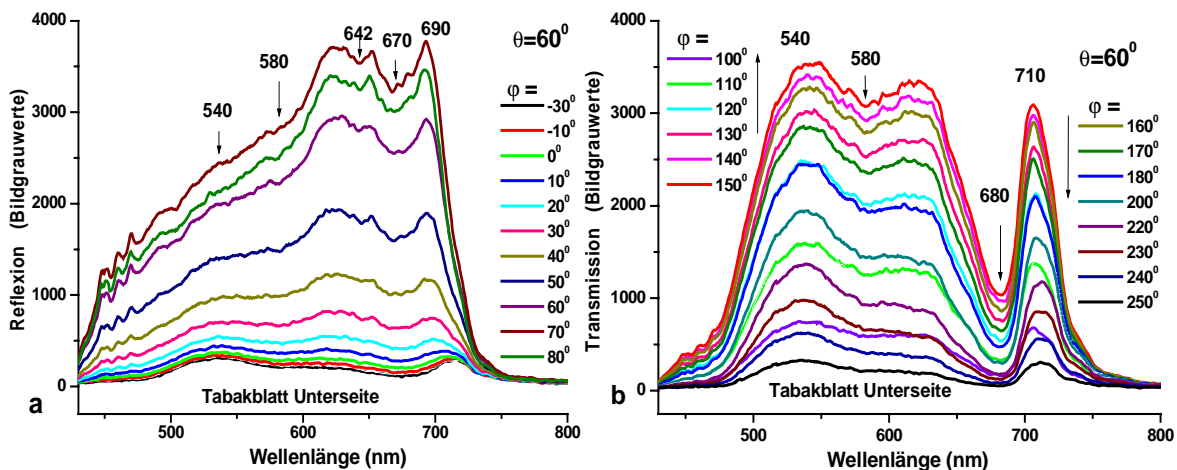


Abb. 6.2.5: Goniometrische Reflexion-(a) und Transmissionsspektren (b) bei schräger Beleuchtung ($\theta=60^\circ$) der Unterseite eines Tabak Blattes und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ .

Für das Tabak (Rizinus) Blatt steigt die Intensität der Transmission im Winkelbereich von 100 - 150 Grad (100 - 170 Grad) zuerst an und sinkt dann wieder. Für eine bessere Darstellung werden hier und auch im folgendem die Werte des Winkels φ in den Abbildungen in zwei Spalten angegeben, die einer Zunahme und einer Abnahme der Intensität der Streustrahlung entsprechen. Beim schrägen Lichteinfall wurden große Veränderungen in den Reflexionsspektren beobachtet, die Form der Transmissionss-

spektren änderte sich dagegen nur wenig. Die Form des Reflexionsspektrum im Bereich der kleinen Winkel ist auch ein wenig geändert. Mit der Zunahme des Winkels φ verringert sich die Reflexion im kurzwelligen 400-600 nm Bereich. Die Strahlung dringt tiefer ins Blatt ein und wird weniger reflektiert. Im langwelligen 620-700 nm Bereich wird die reflektierte Strahlung in einem kleineren Gebiet unweit der Blattoberfläche gebildet, wodurch die Rotbande der Chlorophylle bei 670 nm abgeschwächt wird (Abb.6.2.4a). Ähnliche Gesetzmäßigkeiten wurden auch im Reflexionsspektrum des Tabak Blattes beobachtet (Abb.6.2.5a).

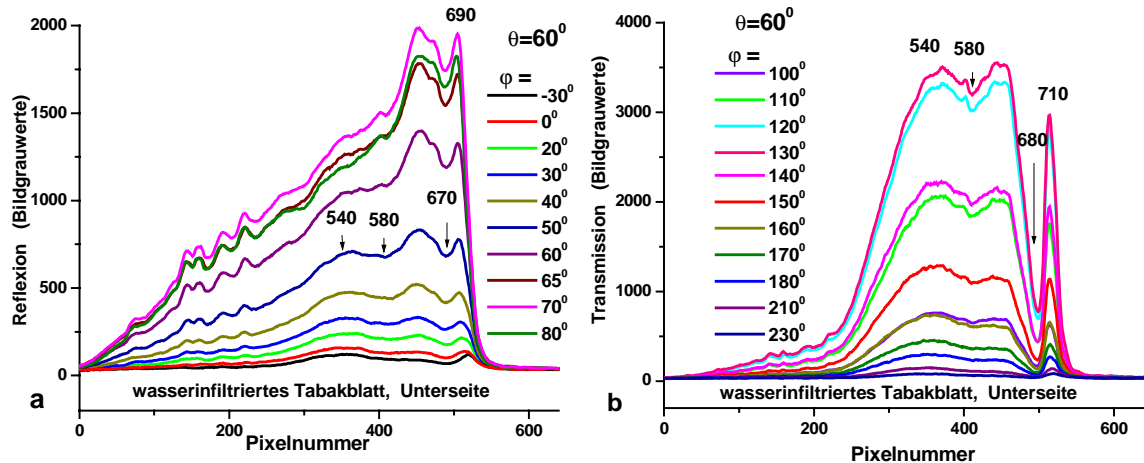


Abb.6.2.6: Goniometrische Reflexion-(a) und Transmissionsspektren (b) bei schräger Beleuchtung ($\theta=60^\circ$) der Unterseite eines wasserinfiltrierten Tabak Blattes und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ des Streulichtes.

Die Reflexions- und Transmissionsspektren eines wasserinfiltrierten Tabak Blattes sind für verschiedene Aufnahmewinkel in Abb.6.2.6 gezeigt. Die Reflexionsspektren nach der Wasserinfiltration ändern sich wenig. Im Transmissionsspektrum wurde hohe Intensität nur in wenigen Winkelbereichen beobachtet. Dies ist mit einer bedeutenden Verminderung der Winkelbreite der Indikatrix verbunden, was im weiteren gezeigt wird.

Vergleich der normierten Spektren

Für eine deutliche Extrahierung der spektralen Gesetzmäßigkeiten wurde ein Vergleich der normierten Reflexions- und Transmissionsspektren durchgeführt. In Abb.6.2.7 sind die normierten Spektren für den senkrechten Lichteinfall auf das Blatt gezeigt. Dabei wurde die Strahlung auf das Transmissionsmaximum bei 700 nm normiert. Aus der Abb.6.2.7a ist es ersichtlich, daß die Absorptionsbanden der Pigmente bei der Reflexion vom Blatt unter einem Winkel von 80 Grad geschwächt werden. Dies kann durch Entstehung des Reflexionslichtes in einer oberflächlichen Schicht der geringere Tiefe für große Streuwinkel erklären werden. Von dem dichteren Blattgeweben der Oberseite des Rizinus Blattes wird die reflektierte Strahlung in einer noch dünneren Oberflächenschicht gebildet. Für das Tabak Blatt steigt im transmittierten Licht die Intensität der Chlorophyllbanden mit der Zunahme des Streuwinkels, d.h. bei dem Übergang von 180 bis zu 100 Grad an (Abb.6.2.7b). Dies wird durch einen größeren optischen Weg erklärt, den das Licht im Blatt für große Streuwinkel zurücklegt. So können Intensitäten der Chlorophyllbanden durch Variationen des Aufnahmewinkels geändert werden.

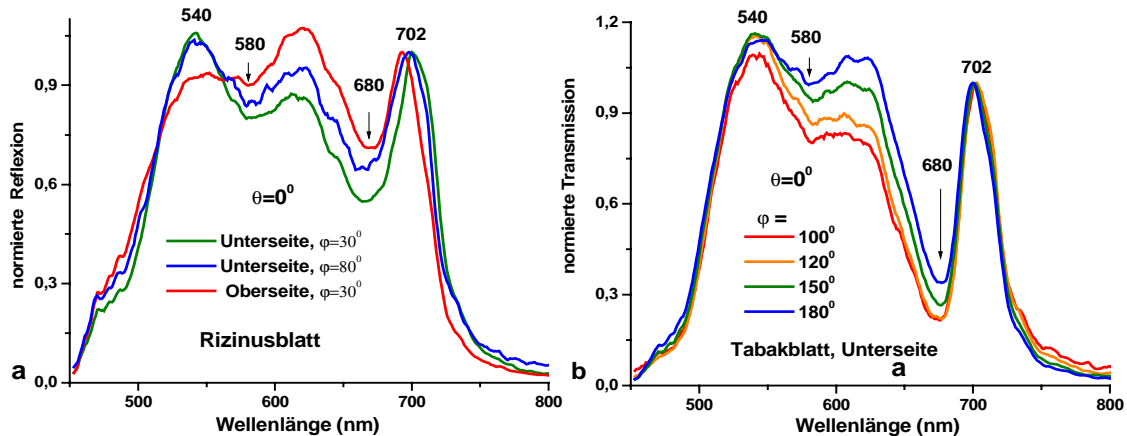


Abb. 6.2.7: Normierte Reflexions-(a) und Transmissionsspektren (b) bei der senkrechten Beleuchtung ($\theta=0^\circ$) eines Rizinus (a) und Tabak Blattes (b).

Die normierten Spektren für den schrägen Einfall ($\theta=60^\circ$) auf das Rizinus Blatt sind in Abb.6.2.8 gezeigt. Es wurde festgestellt, daß die Absorptionsbanden des Chlorophylls in diesem Fall bei einem Streuwinkel von 30 Grad für die reflektierte Strahlung sogar stärker ausgeprägt sind als beim senkrechten Einfall. Dies ist durch den MLS-Einfluß und die Formierung der reflektierten Strahlung in den tieferen Schichten des Blattgewebes bedingt.

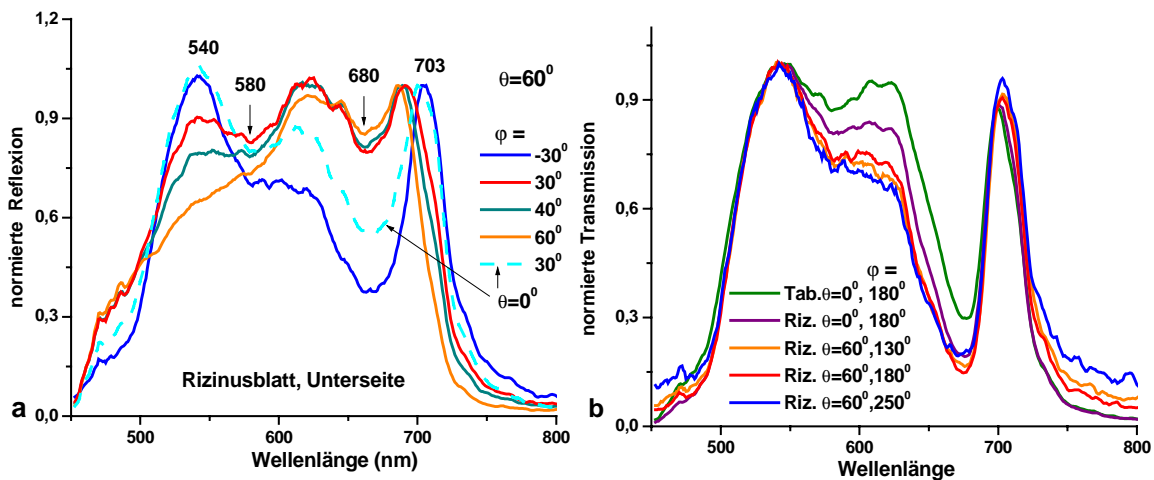


Abb. 6.2.8: Normierte Reflexion-(a) und Transmissionsspektren (b) bei der senkrechten ($\theta=0^\circ$) und schrägen Beleuchtung ($\theta=60^\circ$) der Unterseite von Rizinus und Tabak Blättern.

Mit der Zunahme des Streuwinkels sinkt das Maximum der beobachteten Absorptionsbande bei 680 nm und die Strahlung im Bereich bei 540 nm wird abgeschwächt. Die normierte Absorptionsbande der Chlorophylle im Tabak Blatt ist schwächer als im Rizinus Blatt (Abb.6.2.8b), was auch bei der Spektralmessungen mittels des konventionellen Spektrometers registriert wurde. Die Form des Transmissionsspektrums für Rizinus ändert sich in weiteren Winkelbereichen wenig. Dies ist durch eine Sperrung der Strahlung im Blattgewebe verursacht, denn die Information über die anfängliche Ausbreitungsrichtung der einfallenden Strahlung geht nach der mehrfachen Lichtstreuung verloren.

6.2.2. Spektrale Lichtindikatrizen von Pflanzenblättern

Die Pflanzenblätter haben eine komplizierte inhomogene Struktur. Eine theoretische Beschreibung der Lichtbewegung in Pflanzenblättern ist eine schwierige Aufgabe. Die Prozesse der MLS überlagern sich mit den Prozessen der mehrfachen Diffraction des Lichtes. Eine Diffractionerscheinung könnte an Zellorganellen geschehen, weil die Größe vieler Organelle der Zellen, darunter auch Chloroplasten, mit der Wellenlänge des sichtbaren und NIR Lichtes vergleichbar ist. Dieses Problem ist, ungeachtet der existierenden Rechenmöglichkeiten von einer endgültigen Lösung noch weit entfernt. Digitale Berechnungen zur Modellierung der Lichtbewegung in den Pflanzenblättern haben meistens Demonstrationscharakter. Dabei werden viele Annahme über die Blattstruktur und Form der Streupartikel gemacht. Ebenso die wichtige Eigenschaften, die das Blatt als Einheit beschreiben, wie z. B. kollektive Eigenschaften des Wassers, das die Einheit des ganzen Systems gewährleistet, bleiben unberücksichtigt.

Spektrale Untersuchungen des Streulichtes vom Blatt insbesondere im Bereich der VIS und NIR Absorptionsbanden könnten von großen Bedeutung für die Ausarbeitung der optischen Blattmodelle sein. In Rahmen dieser Arbeit wurden die spektrale Streucharakteristiken von Pflanzenblätter goniometrisch gemessen und die spektralen Daten grafisch, in Form von Polardiagrammen (Indikatrizen) analysiert. Dafür wurde spektrale Lichtintensität bei verschiedenen Wellenlängen in Abhängigkeit vom Aufnahmewinkel φ (Streuwinkel vom Blatt) in Polarkoordinaten dargestellt. Ebenso ist die Analyse der Streu-Indikatrizen auch für ein besseres Verständnis der spektralen Daten erforderlich. Die spektralen Messungen mittels des konventionellen Spektrometers umfassen das Licht von Probe nur in einem schmalen Raumwinkelbereich. Durch die Einbeziehung der spektralen Koordinate in den Sequenzen des Bildspektren wurde es möglich, die Indikatrizen für verschiedene Wellenlänge zu bestimmen, und zwar, sowohl für starke und schwache Absorptionsmaxima der Photopigmente, im Bereich der Durchsichtigkeit der Blätter zwischen den Blau- und Rotbanden von Chlorophyll, als auch im Lumineszenz-Bereich. Die Streu-Indikatrizen wurden bei senkrechtem und schrägem Lichteinfall auf die Blattoberfläche studiert.

Indikatrizen beim senkrechten Lichteinfall

Die spektrale Indikatrizen wurden für die oben beschriebenen goniometrischen Bildspektren (Kapitel 6.2.1) grafisch ermittelt und analysiert. Typische Indikatrizen des Reflex- und des Durchlichtes beim normalen Einfall der Strahlung auf die Unterseite des Tabak Blattes sind in Abb.6.2.9a gezeigt. Die einfallende Strahlung ist mit einem roten Pfeil und die Lage der Blattoberfläche mit einer grünen Linie bezeichnet. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, wurden die größte Intensität des transmittierten und reflektierten Lichtes im Spektralbereich ($\lambda=540$ nm) zwischen den Blau- und Rotbanden der Chlorophylle beobachtet. In Absorptionsbereich ($\lambda=680$ nm) wird die Intensität des transmittierten Lichtes natürlich bedeutend schwächer. Im Bereich der Lumineszenz ($\lambda=690-720$ nm) ist die Intensität der Indikatrix weniger als im Bereich bei 540 nm, was durch die Reabsorption der Lumineszenzstrahlung im Blattgewebe bedingt ist.

Die Indikatrizen der Lichtstreuung für ein reifes Rizinus Blatt sind in Abb.6.2.9b präsentiert. Hier zeigt der rechte Teil der Abbildung den Lichteinfall auf die Oberseite, und der linke den Einfall auf die Unterseite des Blattes. Aufgrund der dichteren Cuticula des Rizinus Blattes im Vergleich zum Tabak Blatt, steigt die Intensität des reflektierten Lichtes an, dabei wird von der Oberseite mehr Strahlung reflektiert als von der Unterseite. Auf der unteren, weniger dichteren Blattseite dringt die Strahlung tiefer ins Gewebe ein und wird stärker absorbiert. In der Indikatrix des vom Blatt transmittierten Lichtes sind solche Unterschiede kaum bemerkbar.

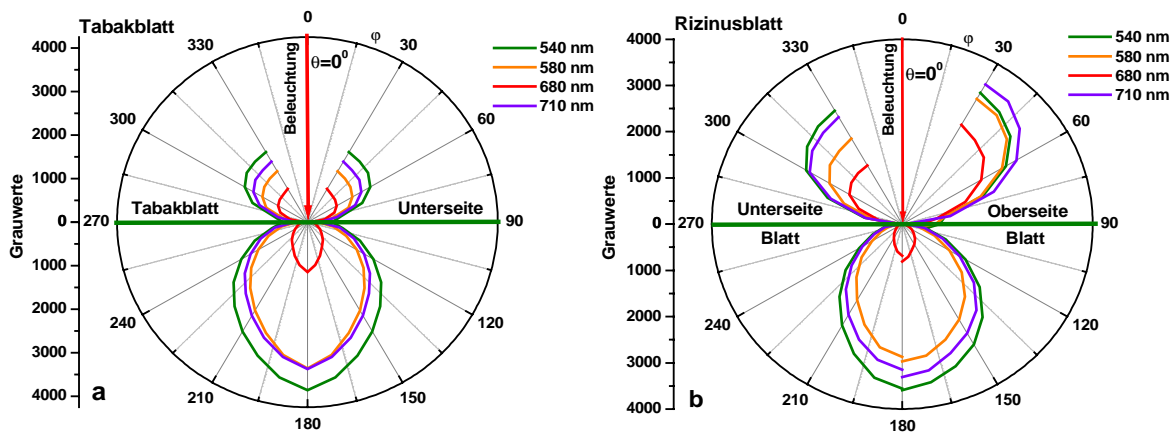


Abb. 6.2.9: Spektrale Indikatrices des Reflex- und Durchlichtes für ein Tabak (a) und Rizinus Blatt (b) beim normalen Lichteinfall ($\theta=0^\circ$) auf die Unterseite des Tabak Blattes (a) sowie für die beide Seiten des Rizinus Blattes (b).

Die Charakteristiken der gemessenen spektralen Lichtstreuung-Indikatrices spiegeln die innere Struktur des Blattes wider. Wegen des Unterschiedes im Blattbau zwischen Tabak und Rizinus Blättern ist ein Vergleich ihrer Indikatrices von Interesse. In Abb.6.2.10a ist das Polardiagramm der Verhältnisse der Transmission und Reflexion für die Rizinus und Tabak Blätter dargestellt.

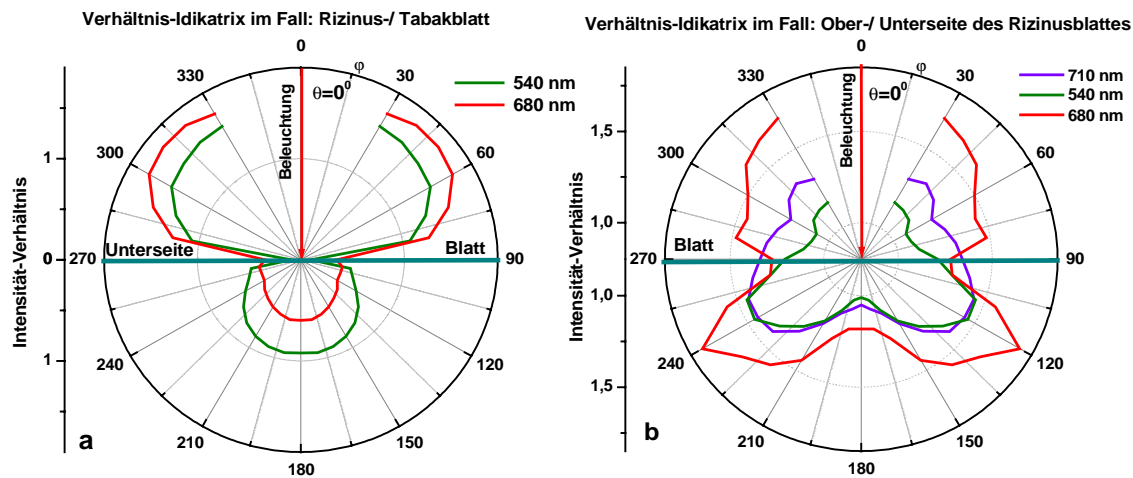


Abb. 6.2.10: Verhältnis-Indikatrices im Fall: Rizinus- / Tabak Blatt beim senkrechten Lichteinfall ($\theta=0^\circ$) an die Unterseite der Blätter. (a) und im Fall: Ober- / Unterseite eines Rizinus Blattes (b).

Dieses Polardiagramm illustriert noch deutlicher die größere Reflexion und die niedrigere Transmission des Rizinus Blattes im Vergleich zum Tabak Blatt. Dabei ist diese Asymmetrie für die starke Absorptionsbande des Chlorophylls bei 680 nm besonders stark ausgeprägt. Die effektive Reflexion am Rizinus Blatt geschieht in einem breiteren Winkelbereich. Der effektive Raumwinkel der transmittierten Strahlung vom Absorptionsbereich bei 680 nm wird kleiner, da in der Nähe von 180 Grad die Licht-Weglänge im Blattgewebe am kürzesten ist. In Abb.6.2.10b sind die Verhältnisse der Indikatrices für den Lichteinfall auf die Ober- und Unterseite des Rizinus Blattes gezeigt. Die Maxima bei 120 und 240 Grad für alle Wellenlänge sind durch große Halbbreiten der Indikatrix beim Lichteinfall auf die Oberseite vom Rizinus Blatt bedingt. Am stärksten ist diese Asymmetrie für die Absorptionsbanden des Chlorophylls ausgeprägt.

Abb.6.2.11 zeigt die Indikatrix für junges Rizinus Blatt. Die Reflexions- und Transmissions-Polardiagramme sind für junges Blatt schmalere gegenüber dem reifen Rizinusblatt, was durch den kleineren Interzellularraum in jungen Blättern erklären kann. Außerhalb den Absorptionsbanden kann die normierten Indikatrizen transmittiertes Lichtes als Funktion $I \sim \cos^2 \varphi$ beschrieben. Im Bereich der Absorptionsbande bei 680 nm haben diese Indikatrizen die kleinste Halbwertsbreite, was durch eine starke Absorption der Strahlung beim schrägen Laufweg des Streulichtes bedingt ist.

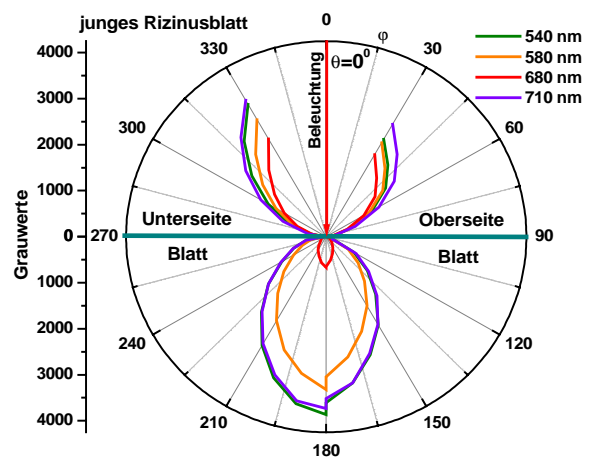


Abb.6.2.11: Spektrale Indikatrix für die Unter- und Oberseite junges Rizinus Blattes.

Indikatrizen beim schrägen Lichteinfall

Die Analyse der spektralen Indikatrizen beim schrägen Einfallswinkel θ des Lichtes auf die Blattoberfläche liefert zusätzliche Kenntnisse von der Blattoptik. In Abb.6.2.12 sind Indikatrizen für Tabak und Rizinus Blätter bei $\theta=60^\circ$ gezeigt. Die Richtung der einfallenden Strahlung ist mit einem roten Pfeil und die Lage der Blattoberfläche mit einer grünen Linie bezeichnet. Vor allem ist es nötig, die engere Breite des Reflexions- gegenüber dem Transmissionsdiagramm (Abb.6.2.12a). Dies ist durch die Erhöhung des Beitrages der Spiegelreflexion mit der Zunahme des Einfallswinkels und die Senkung der diffusen Reflexion bedingt. Ein ähnlichen Zusammenging ist auch für Rizinusblätter zu beobachten (Abb.6.2.12b). Für transmittierte Strahlung ist der MLS-Einfluß von Bedeutung. Deshalb haben Transmission-Indikatrizen eine große Halbwertsbreite. Dabei wurde eine signifikante Abweichungen von Reflexions- und Brechungsgesetzen der geometrischen Optik für homogene Medien festgestellt. Das Reflexionsmaximum für Tabak Blatt verschiebt sich von 60 zu 70 Grad. Für transmittiertes Licht wird eine noch größere Winkelverschiebung beobachtet: von 120 bis zu 145 Grad (d.h. eine Abweichung von 25 Grad). Für das Rizinus Blatt ist diese Abweichung noch größer und beträgt fast 55 Grad. An sukkulenten Kalanchoe Blättern wurde eine eben so große Abweichung für das Transmissionslicht registriert. Diese Abweichung von Gesetzen der homogenen Medien übersteigt den Meßfehler beträchtlich. Es könnte nur durch eine starke MLS erklärt werden. Aufgrund der mehrfachen Streuung "vergißt" das Licht seine ursprüngliche Ausbreitungsrichtung. Beim schrägen Einfall steigt die effektive Weglänge der Lichtbewegung im Blattgewebe an.

Die kürzeste Strecke für das Lichtdurchgang durch ein Medium liegt entlang der Normalen. Dies wird durch einen fast senkrechten Ausgang der transmittierten Strahlung und auch durch eine bedeutende Reduktion der Transmission im Vergleich zu dem senkrechten Lichteinfall im Rizinus Blatt bestätigt (Abb.6.2.12b). Beim schrägen Einfall verringert sich die Durchdringung des reflektierten Lichtes ins Blattgewebe, und die Intensität der Lumineszenz und auch die Reflexion im Bereich der Absorptionsbanden des Chlorophylls steigen an. Der Beitrag der MLS in die Interaktionsprozesse des Lichtes mit dem Blatt ist für die wasserinfiltrierten Blätter kleiner. Dies ist durch das Ausfüllen des Interzellularenraums mit Wasser und den kleineren Unterschied zwischen den Brechungsindizes vom Blattgewebe und Wasser im Vergleich zum Luft bedingt. Abb.6.2.12c zeigt die Licht-Indikatrix des wasserinfiltrierten Tabak Blattes. Die

Halbwertsbreite der Indikatrix für die transmittierte Strahlung im diesem Fall ist kleiner, weil das MLS Niveau bei der Wasserinfiltration des Blattes natürlich sinkt.

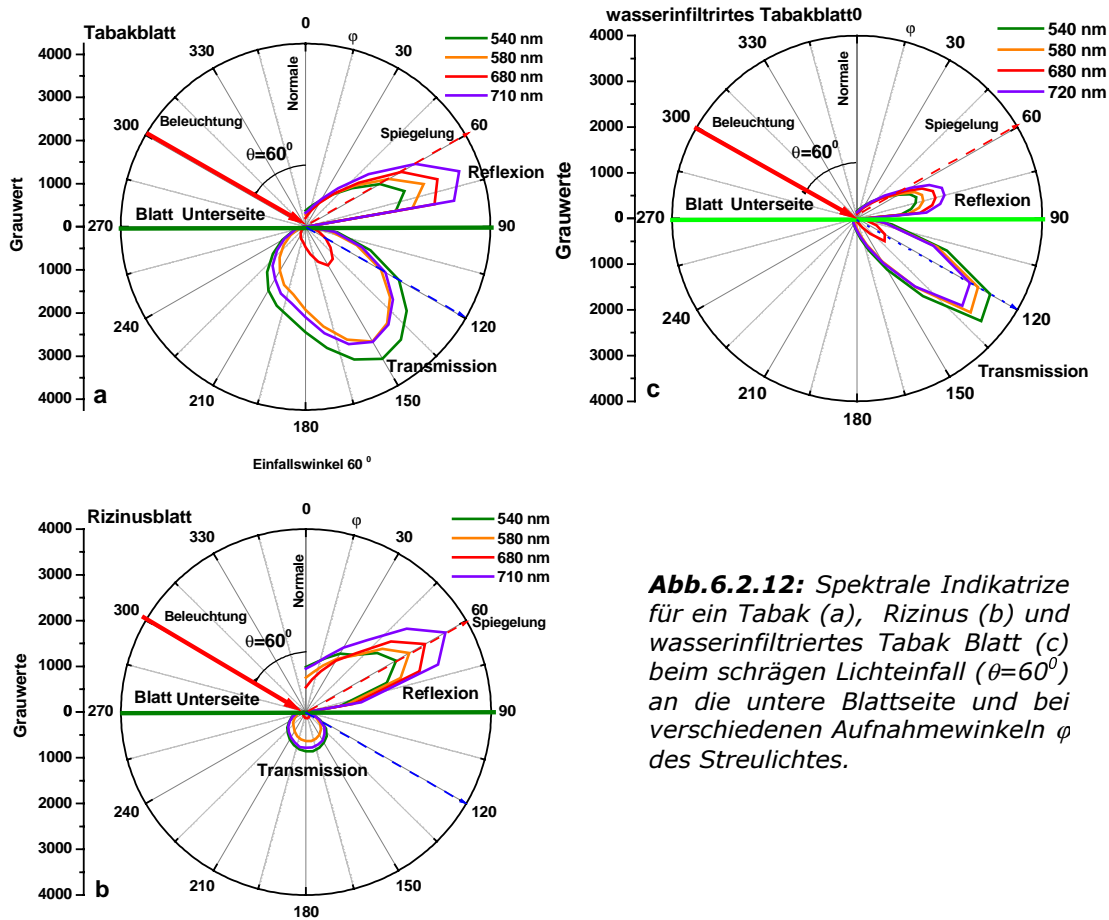


Abb. 6.2.12: Spektrale Indikatrixe für ein Tabak (a), Rizinus (b) und wasserinfiltriertes Tabak Blatt (c) beim schrägen Lichteinfall ($\theta=60^\circ$) an die untere Blattseite und bei verschiedenen Aufnahmewinkeln φ des Streulichtes.

Die Ergebnisse sind in Abb. 6.2.13a zusammengefaßt. Diese Abbildung zeigt in Übersichtsweise die normierte Indikatrixen von untersuchten Blättern bei der schrägen Beleuchtung der Blattoberfläche. Die kleinste Abweichung vom Winkel 120° für das Durchlicht wird für das wasserinfiltrierten Tabak Blatt beobachtet. In diesem Fall sind die Winkelbreiten des Durch- und Reflexlichtes ungefähr gleich. Mit der Zunahme der MLS in dem nicht infiltrierten Tabak Blatt erreicht die Winkelabweichung $\Delta\varphi$ für die Transmission fast 30° . Gleichzeitig wächst auch die Winkelhalbertsbreite $\delta\varphi$ der Indikatrix der Transmission. Die Absorption des Lichtes bei 680 nm macht die Indikatrix nur schmalere, bewirkt aber keine Reduzierung der Winkelabweichungen. Im Rizinus Blatt erreicht die Winkelabweichung ihren maximalen Wert von ~ 55 Grad und die Lichtstrahlung verläßt das Blatt fast entlang der Normale. Dabei erreicht die auf dem Niveau 1/2 bestimmte Winkelhalbertsbreite $\delta\varphi$ 114 Grad. Die Werte der beobachteten Abweichung $\Delta\varphi$ für die transmittierte Strahlung und die Winkelhalbertsbreite der Indikatrix $\delta\varphi$ können ein Maß für den Einfluß der MLS auf die Lichtbewegung in inhomogenen Medium sein.

Ein Zusammenhang der Halbwertsbreiten $\delta\varphi$ und der Winkelverschiebung $\Delta\varphi$ für charakteristische Wellenlänge ist in Abb. 6.2.13b dargestellt. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, daß sich die Halbwertsbreite $\delta\varphi$ ungefähr linear mit der Winkelabweichung $\Delta\varphi$ ändert. Der Proportionskoeffizient beträgt fast 2,6. Es ist bemerkenswert, daß die Abweichung der Spiegelreflexion-Richtung an wasserinfiltriertem Tabak Blatt nicht kleiner wird, sondern sogar etwas ansteigt. Deshalb kann diese Abweichung nicht ausschließlich durch den MLS-Einfluß erklärt werden. Unser Meinung nach könnte eine Näherung der Reflexion-Indikatrix zur Blattoberfläche durch lichtleitende Eigenschaften von Cuticula und oberen Schichten des Blattgewebes bedingt werden. Ebenfalls wurde es bei Untersuchung der Querdiffusion der VIS und NIR Strahlung im Blattgewebe gezeigt,

daß dies auch durch kollektive Eigenschaften von Wasser in den Pflanzenblättern erklären kann.

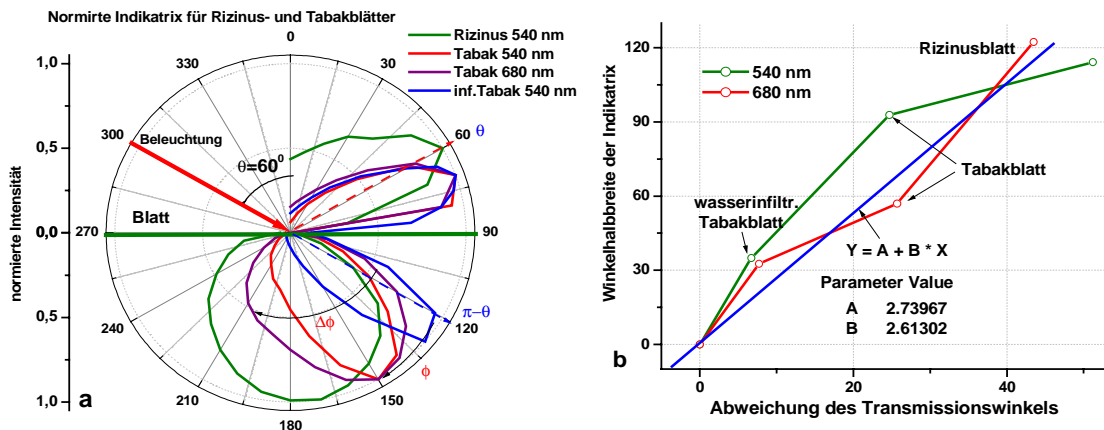


Abb. 6.2.13: Normierte Indikatrizen (a) beim schrägen Lichteinfall ($\theta=60^\circ$) an die Unterseite und Zusammenhang (b) der Halbwertsbreiten $\Delta\phi$ und der Winkelverschiebung $\Delta\phi$ bei der charakteristischen Wellenlänge für die Tabak, Rizinus und wasserinfiltrierten Tabak Blätter.

Es wurde ein Vergleich der Indikatrizen im Falle $\theta=60^\circ$ für Tabak und Rizinus, sowie für wasserinfiltrierte und nicht wasserinfiltrierte Tabakblätter durchgeführt. (Abb.6.2.14) Das Verhältnis der Indikatrizen vom Tabak Blatt für eine Wellenlänge von 720 und 540 nm demonstriert ein Anstieg der Reflexionsintensität bei 720 nm ungefähr um das 1,5fache. Es ist durch eine stärkere Absorption des grünen Lichtes vom Chlorophyll bedingt. Das Verhältnis der Indikatrizen vom Tabak und Rizinus zeigt, daß in der Nähe von 110-120 Grad die Intensitäten der transmittierten Strahlung bei 540 nm im Tabak bei $\theta=60^\circ$ um 5-11fache größer ist als im Rizinus Blatt. Es ist mit der stärkeren Sperrung des Lichtes im Rizinus Blatt und Senkung der transmittierten Strahlung gebunden. Die Strahlungssperrung wird auch vom Verhältnis der Indikatrizen für nicht infiltrierte und wasserinfiltriertes Tabak Blatt bestätigt (Abb.6.2.14b). Dieses Verhältnis der Indikatrizen zeigt um wieviel Mal die Summe der MLS und Reabsorption im nicht infiltrierte gegenüber dem wasserinfiltrierten Blatt größer ist. Am stärkste ist die Lichtsperrung im Blatt bei 210 und 30 Grad, d.h. unter einem Winkel von 90 Grad zur einfallenden Strahlung.

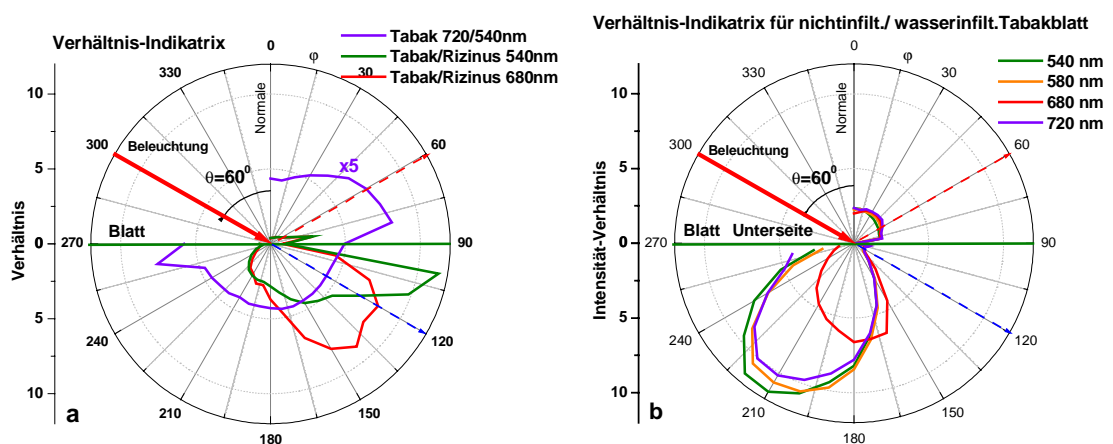


Abb. 6.2.14: Verhältnis-Indikatrizen (beim schrägen Lichteinfall ($\theta=60^\circ$) auf die Unterseite der Tabak und Rizinus Blätter a). und für die nicht infiltrierte und wasserinfiltrierten Tabakblätter (b).

Die durchgeführte Analyse der spektralen Indikatrizen hat gezeigt, daß solche modifizierten Indikatrizen für die Untersuchung der Interaktionsprozesse des Lichtes mit der Blattstruktur sehr informativ sind. Damit sind die spektrale Indikatrizen für die Erforschung der Blattoptik besonders geeignet.

6.3. Bildgebende VIS-Spektroskopie an Pflanzenblättern

Das CCD Prismenspektrometer ermöglichte die Spektralcharakteristiken der Blätter räumlich hoch aufgelöst zu messen. Die volle spektrale Information von ganzem Blatt kann durch ein Scanning der Monochromator-Spalte über die Blattoberfläche erreicht werden. Solches Scanning ist aber sehr zeitaufwendig und erfordert nach der Messung eine Bearbeitung der umfangreichen Bilddaten. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der bildgebenden Spektroskopie (Kapitel 5.1) ist dagegen ein funktionssicheren Verfahren für die schnellere Messungen der räumlichen Chlorophyll- und Wasser-Verteilung an Pflanzenblättern. Dafür wurden die diskreten Spektralaufnahmen von ganzem Blatt in den ausgewählten Wellenlängen λ_n gemacht. Eine CCD-Kamera und ein Satz von Bandpaßfiltern wurden hierfür verwendet. Diese Methode ist weniger aufwendig und ermöglichte zeitlich höher aufgelöst Sequenzen der Spektralbilder von ganzen Blättern zu erhalten. Mit Hilfe der spektralen Bildsequenzen kann das dynamische Verhalten der spektralen Eigenschaften der Inhaltstoffen in jedem Punkt des Blattes untersucht werden. Somit wurde zum ersten Mal die räumliche Verteilung der Chlorophyllabsorption und die Profilbilder des Chlorophyllgehaltes an Pflanzenblättern visualisiert und quantitativ analysiert. Dabei wurden spektrale Unterschiede für die Blattgewebe und Adern festgestellt. Zum ersten Mal wurden die Raumspektren von Phosynthesepigmenten *in vivo* ausgewertet, die kein Analog haben.

6.3.1. Spektralbilder der Pflanzenblättern im VIS-Bereich

Für die Spektralaufnahmen im VIS Bereich wurden zwei PixelFly Kameras mit einer Auflösung des CCD- Sensors von 480x640 und 1024x1280 Pixel verwendet. Die Aufnahmen wurden in Spektralbereich von 400 bis 1050 nm durchgeführt. Diese ermöglichte die Blau- und Rotbanden der Chlorophyllabsorption zu untersuchen. Dafür wurde ein Satz von 19 Bandpaßfiltern im Spektralbereich 400-850 nm (450, 500, 512, 522, 530, 535, 550, 560, 600, 650, 660, 670, 680, 700, 730, 750, 780, 800 und 850 nm) eingesetzt. Damit wurden sowohl die Form der Rotbande der Chlorophyllabsorption für die Tabak und Rizinus Blätter als auch die Form des MLS-Spektrums im Bereich dieser Bande untersucht. Die Erfassung der Interaktion der MLS und Absorption erlaubt die Istdaten der Absorptionsbanden für die Blattgewebe und Adern zu ermittelt. Dies ermöglichte eine gründliche Untersuchung der Chlorophyllverteilung und -zustände in Blattgeweben und Adern.

Eine Sequenz der Spektralbilder von Pflanzenblättern $I(\lambda_n)$ und des Beleuchtungsfeldes $I_0(\lambda_n)$ wurde mit Hilfe der CCD Kamera und geeigneten Bandpaßfilter aufgenommen. Die Transmissionsbilder wurden als Ratio-Bilder (Verhältnis von Bildern) $T(\lambda_n) = I(\lambda_n) / I_0(\lambda_n)$ ausgewertet. Dafür wurden spezielle Workspaces entwickelt und die Bildverarbeitung mit Hilfe der Software "Heurisko" durchgeführt (Kapitel 5.1). Abbildungen 6.3.1 und 6.3.2 zeigen die ausgewerteten Transmissionsbilder von Rizinus und Tabak Blättern in Spektralbereichen der Chlorophyllabsorption bei 450 und 680 nm sowie im Durchlaßbereich bei 550 nm. Die Transmissionswerte wurden in den Abbildungen ebenfalls angegeben.

Wie aus Abb.6.3.1 und 6.3.2 ersichtlich ist, sind große Unterschiede der Spektralbilder von verschiedenen Spektralbereichen für die untersuchten Blättern charakteristisch. Im Spektralbereich der Chlorophyllabsorption ist der Transmissionsgrad für ein 500-600 μm dickes Tabak Blatt (Feldblatt) um 2,5-10 Mal niedriger als die Durchsichtigkeit für ein dünneres (ca. 200 μm dickes) Rizinus Blatt. Anders herum ist im Spektralbereich bei 550 nm das Tabak Blatt mehr durchsichtiger als das Rizinus Blatt. Die quantitative Analyse

der Spektralbilder läßt erste Rückschlüsse über die Verhältnisse der Gewebestruktur und des Chlorophyllgehaltes in beiden Blättern zu.

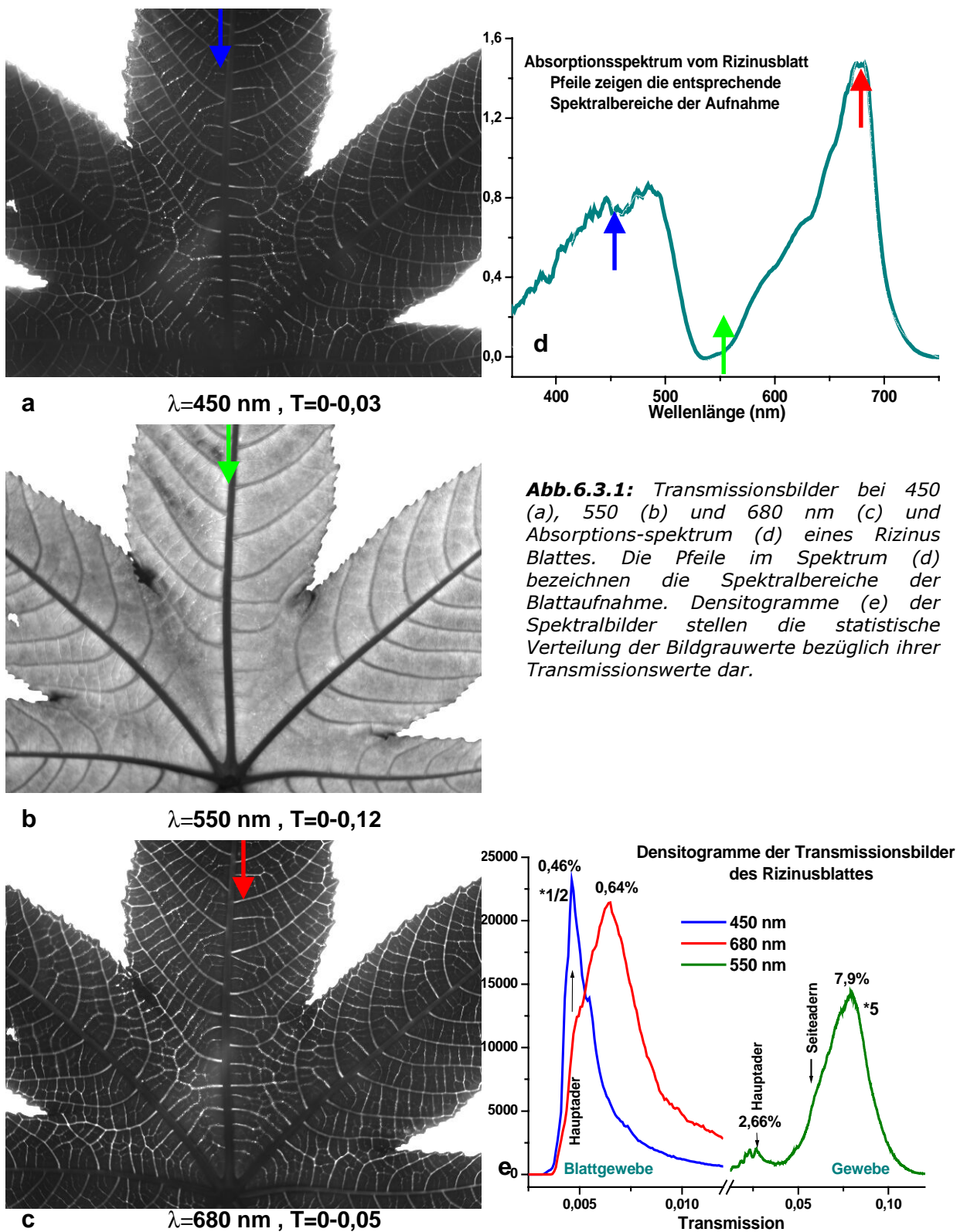


Abb. 6.3.1: Transmissionsbilder bei 450 (a), 550 (b) und 680 nm (c) und Absorptionsspektrum (d) eines Ricinusblattes. Die Pfeile im Spektrum (d) bezeichnen die Spektralbereiche der Blattaufnahme. Densitogramme (e) der Spektralbilder stellen die statistische Verteilung der Bildgrauwerte bezüglich ihrer Transmissionswerte dar.

Räumliche Verteilung der Grauwerte in den Spektralbildern bei 680 nm entspricht die räumlichen Verteilung der Photosynthesepigmente über die Blattfläche. Im Bereich der Absorptionsbanden sehen die Blattgewebe und Hauptadern dunkel aus und die kleine

Seitenadern hell aus. Es kommt zum Vorschein ein Aufhellungs-Effekt von kleinen Adern. Die Aufhellung der feinen Adern äußert sich bei 680 nm besonders stark. Im Bereich zwischen den Chlorophyllbanden bei 550 nm sieht Blattgewebe hell aus und die Seitenadern sind dunkeln. Die Aufhellung der kleinen Adern ist somit wellenlängenabhängig.

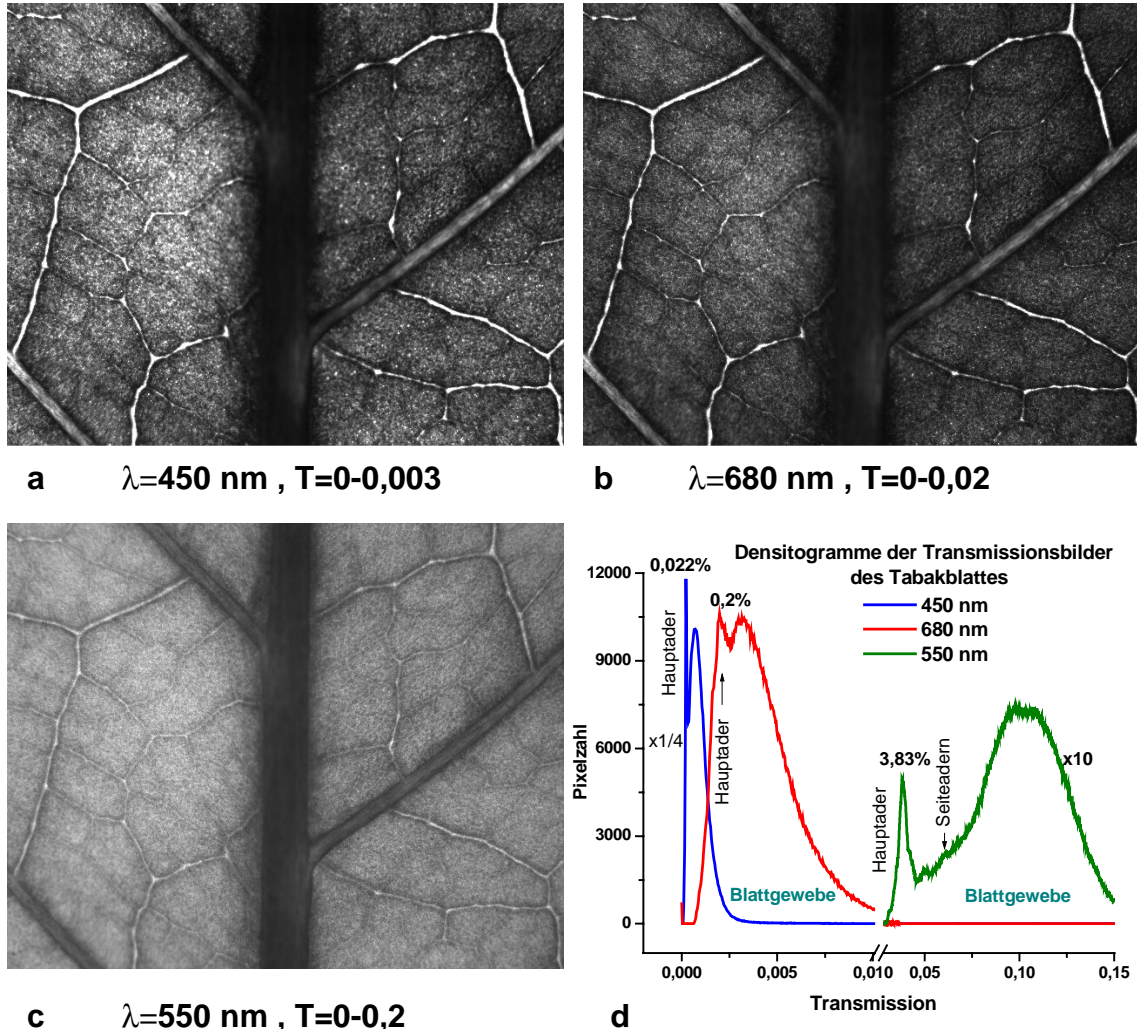


Abb. 6.3.2: Transmissionbilder bei 450(a), 550(b) und 680 nm(c) eines Tabak Feldblattes. Densitogramme (d) der Spektralbilder zeigen die statistische Verteilung der Grauwerte bezüglich der Transmissionswerte.

6.3.2. Densitogramm-Spektral-Analyse der *in vivo* Chlorophylle

Die quantitative Spektralanalyse der Bildsequenzen wurde mit Hilfe der DSA Methodik durchgeführt. Diese Methodik wurde zusammen mit Dr. M. Korniyenko (Universität Tarasa Schewtschenko, Kiew, Ukraine) für die Ermittlung der Spektralcharakteristiken des Objektes aus seinen Spektralbildern entwickelt. Spektrale Densitogramme, das heißt Densitogramme der Bilder von engen Spektralbereichen, geben die statistische Verteilung der Bildpixel von gleichen Grauwerten in bezug auf die Transmissions- oder Absorptionswerte wieder. Damit sind spektrale Densitogramme ein Verbindungsglied zwischen den Spektralbildern und den Spektralcharakteristiken von Blättern. Die DSA Methode ermöglicht Signale zu sammeln, die von dem verzweigten System der Blattadern sowie von anderen räumlich getrennten Teilmengen der Bildpixel mit der ähnlichen Spektralcharakteristiken ausgegangen sind.

Die typischen Densitogramme für die Spektralbilder der Rizinus und Tabak Blätter von diskreten Wellenlängen bei 450, 550 und 680 nm sind in Abb.6.3.1e und 6.3.2d dargestellt. Der Unterschied in Grauwerten der Spektralbilder für die Blattgewebe und Adern ist bei der Wellenlänge 550 nm besonders gut ersichtlich. Die breite Hauptbanden der Densitogramme entsprechen dem Feld des Blattgewebes (hell für $\lambda=550$ nm). Ein scharfer Peak im Densitogramm des Tabak Blattes bei dem Transmissionswert von 3,83 % entspricht der Hauptader. Die Densitogramm-Bande von Hauptadern für das Rizinus Blatt bei 550 nm hat mehrere Maxima. Sie sind durch die unterschiedliche Transmission der verschiedenen Adern und möglicherweise durch die Aderstruktur bedingt. Die große 5-7 mm dicke Ader des Tabak Feldblattes weist mehr homogene optische Charakteristiken auf, weil den homogenen Strukturen des Objektes die engen und intensiven Banden des Densitogramms entsprechen.

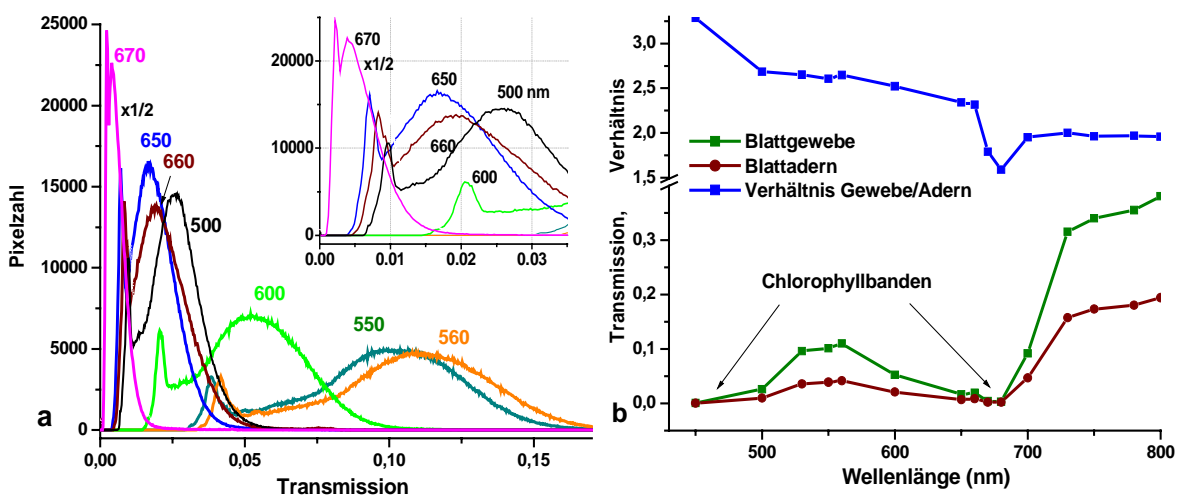


Abb.6.3.3: Densitogramm-Familie der Spektralbilder eines Tabakblattes (a). Transmissionsspektren und Ratio-Spektrum für Blattgewebe und Adern (b), die aus den spektralen Densitogrammen ermittelt wurden.

Den Seitenadern entsprechen im Densitogramm die schwachen Maxima zwischen dem Peak von Hauptadern und der Bande vom Blattgewebe. Im Densitogramm des Rizinus Blattes werden die Banden der Seitenadern mit der Bande des Blattgewebes stark überlagert. Im Gegenteil ist das Densitogramm-Maximum der Hauptader des Tabak Blattes in den Spektralbildern bei 450 und 680 nm gut ausgeprägt. (Abb.6.3.2d).

In Abb.6.3.3a und 6.3.4a. ist eine Übersicht der spektralen Densitogramm-Familien der Tabak und Rizinus Blätter gezeigt. Im Spektralbereich von 500-680 nm konnten die größten Transmissionswerte dieser Blättern gemessen werden, so erreicht Transmission 9-12 % im Bereich bei 560 nm. Jedem von den gemessenen Densitogramm-Maxima entspricht eine charakteristische Spektrentyp. Auf diese Weise können die Chlorophyllspektren für die Blattgewebe und Adern getrennt analysiert werden. Die DSA Methode ermöglicht die Spektren auszuwerten:

1. nach der Lage der Densitogramm-Maxima an der Transmissions-, Extinktions- und Absorptionsskala (Analog zu den konventionellen Spektren);
2. nach der Höhe (Intensität) der Densitogramm-Maxima, das heißt nach der Anzahl von Bildpixeln der gleichen Grauwerte (Raumspektren -ein innovativen Spektrentyp).

Dank solcher spektralen Darstellungsweise werden die optischen Charakteristika von untersuchten Blättern und von ihren Strukturelementen deutlich. Dies ermöglicht eine Vielzahl von innovativen Möglichkeiten für die Spektralanalyse. Zum Beispiel dank solchen Spektren wurden die kollektiven Eigenschaften der verschiedenen energetischen Zustände von Molekülen erfasst und analysiert. Ebenso wurden die Depolarisation-Eigenschaften der Blätter auf solche Weise analysiert.

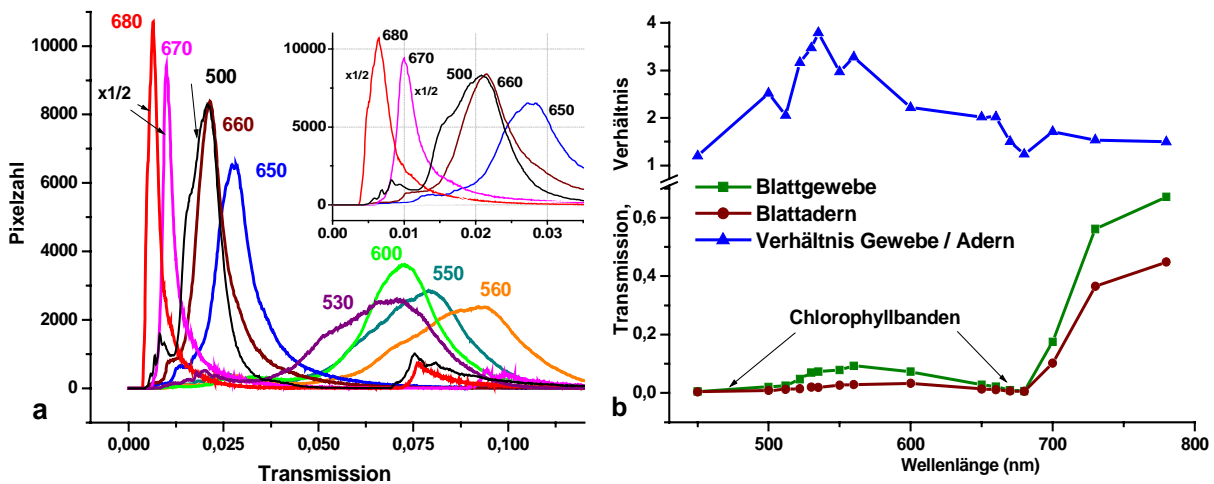


Abb.6.3.4: Densitogramm-Familie von Spektralbildern eines Ricinusblattes (a). Transmissionsspektren und Ratio-Spektrum für Blattgewebe und Adern (b), die aus den Densitogrammen ermittelt wurden .

Die erste Art der Spektren entspricht den konventionellen Spektren, die eine Verbindung der Zustände von Molekülen in verschiedenen Zeitmomenten charakterisieren. Für die Ermittlung dieser Spektralkurven wurden die Spektralwerte (Absorptions-, Transmissionsgrad) der Densitogramm-Maxima von Spektralbildern an der Wellenlänge-Skala angetragen. Nach den Lagen von zwei entsprechenden Densitogramm-Maxima an der Transmission-Skala wurden die Transmissionsspektren für die Gewebe und Hauptadern der Tabak und Ricinus Blätter ausgewertet. Sie sind in Abb.6.3.3b und 6.3.4b. dargestellt. Die Kurve der Transmissions-Quotienten des Blattgewebes und der Adern ist dort ebenfalls gezeigt. Im Vergleich zu den Blattadern ist die Durchsichtigkeit des Blattgewebes um einen Faktor von 1,2-3,8 größer. Die kleinsten Transmissions-Unterschiede des Gewebes und der Adern wurden im Bereich der Absorptionsbanden der Chlorophylle festgestellt.

In dem Langwellenbereich von 730 bis 850 nm liegen keine starken Chlorophyllbanden, so daß hier die Durchsichtigkeit der Blätter steigt. Dabei verschieben sich die Densitogramm-Banden zum Bereich der hohen Transmissionswerte. Die Maxima von Hauptadern verschieben sich bis zu den Transmissionswerten von 20 - 43%. Für das Blattgewebe erreicht Transmission 40 und 67% im Spektralbereich von 730 bis 850 nm (Abb.6.3.3b und 6.3.4b). Andererseits ist die Transmission der Blätter, die mittels des VIS IR Spektrometers gemessen wurden, weniger als 1%, was auf den großen Anteil der nicht gesammelten Streustrahlung hindeutet. Die Transmission der Blätter, die mit Hilfe des entwickelten bildgebenden CCD-Spektrometers gemessen wurde, erhöht sich ungefähr in 50 Mal. Das entwickelte Modell des CCD-Spektrometers weißt eine höhere Sensibilität im Vergleich zu den konventionellen Spektrometern auf. Dies wird durch die Ansammlung der ähnlichen Signale durch die großen Pixelanzahl des Spektralbildes (1024*1280) und durch die Sammelfunktion des Kameraobjektives bedingt.

Methodik des "Eintauchen" der Absorptionsbanden im MLS-Untergrund

Zusammen mit Dr. M. Korniyenko (Universität Tarasa Schewtschenko, Kiew; Ukraine) wurde eine neue Methodik für die Analyse von Interaktionsprozessen der MLS und Absorption entwickelt, die "das Eintauchen der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund" berücksichtigt. Dies ermöglicht die Istwerte der Absorptionsbanden von Chlorophyll und Wasser auszuwerten. Die Methodik beruht darauf, daß der MLS-Beitrag in der Extinktion im Bereich der Absorptionsbanden abnimmt. In der grafischen Darstellung der Extinktions-spektren kann dieser Effekt als "das Eintauchen" der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund bezeichnet werden. Infolge des Effektes "Eintauchen in den MLS-Untergrund" können die realen Absorptionsbanden die beobachteten Spektralbanden um das Vielfache übersteigen.

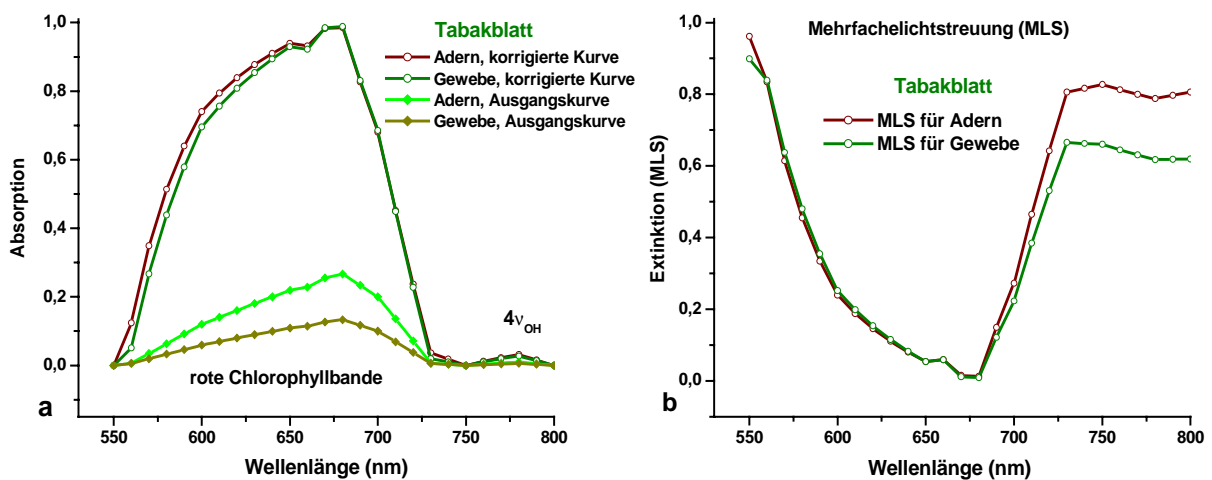


Abb. 6.3.5: Ausgangskurven und die korrigierten Absorptionsspektren(a) sowie ausgewertete MLS-Extinktionsspektren (b) für Gewebe und Adern eines Tabakblattes.

Entsprechend der allgemeingültigen Methodik für das Extrahieren der Absorptionsbanden aus dem nicht selektiven MLS-Untergrund ist die Chlorophyllbande für das Gewebe intensiver als für die Adern vom Tabak Blatt (Ausgangskurven in Abb.6.3.5a). Jedoch sollte Intensität der Absorptionsbanden unter die Berücksichtigung der Frequenz-abhängigkeit des MLS-Niveaus und "das Eintauchen" der Absorptionsbanden im MLS-Untergrund berechnet werden. Deshalb wurden die Absorptionsbanden als Differenz der Extinktions- und der MLS-Spektren ermittelt (Abb.6.3.7).

Das selektive MLS-Niveau wurde laut der folgenden Überlegung berechnet: Die von der CCD-Kamera registrierte Transmissionsstrahlung ist nichts anderes als das MLS-Niveau, welches in einigen Spektralbezirken durch die Banden der Resonanzabsorption geschwächt wird. Ein Schwächung-Faktor in diesen Spektralbezirken ist B/T (Abb.6.3.6). Infolgedessen, könnten die Istwerte der MLS im Extinktionsspektrum als $(1-B) \cdot T/B$ ausgerechnet werden.

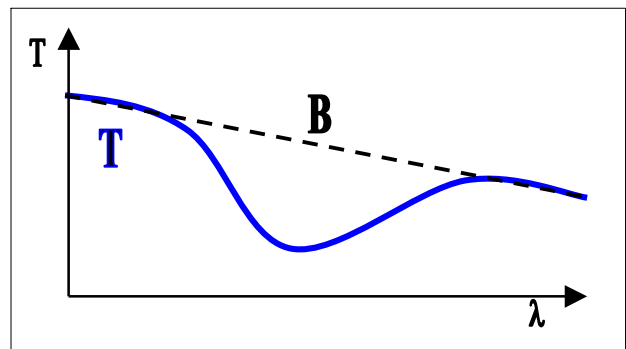


Abb. 6.3.6: Erläuterungen zum Text über die Auswertung des MLS-Beitrages zu den Absorptionsbanden. **B** - Basislinie der MLS; **T** - Transmissionskurve.

Nach diesem Verfahren wurden die MLS-Spektren im Bereich der Absorptionsbanden von Chlorophyll und Wasser ermittelt. Es wurde zum erstenmal festgestellt, daß die reale Chlorophyll-Absorptionsbanden für das Gewebe und für die Adern vom Tabak Blatt annähernd gleich sind (Abb.6.3.5a)

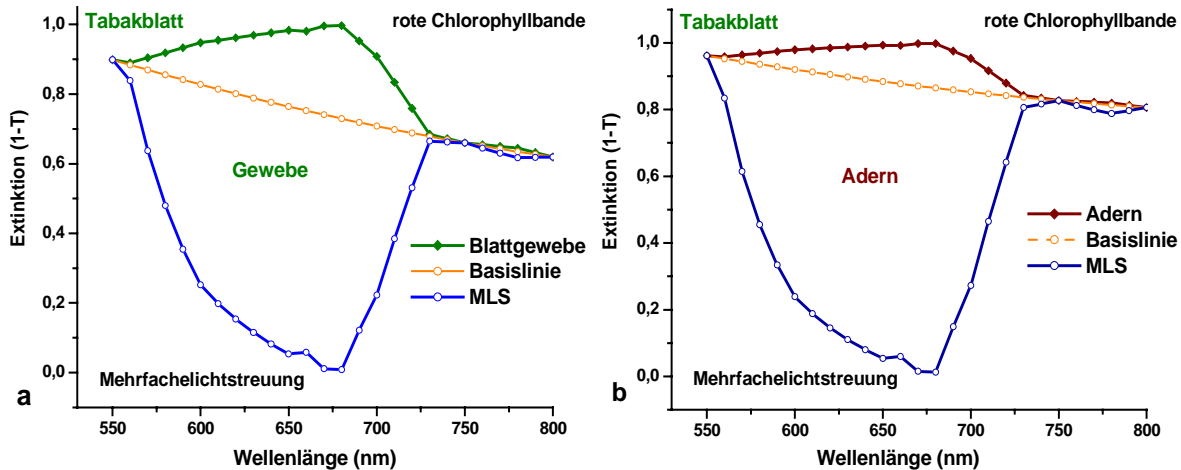


Abb.6.3.7: Ausgangskurven und ausgewertete MLS-Kurven der Extinktionsspektren von Gewebe (a) und Adern (b) eines Tabak Blattes für die Bestimmung der realen Absorptionsspektren.

Entsprechend der Abb.6.3.7 steigert die MLS auf den Bandenflanken. Die entwickelte Methodik ermöglicht auch, die Form der Spektren der MLS im Spektralbezirk der Chlorophyllabsorption zu ermitteln (Abb.6.3.5b). Die MLS-Spektren antikorrelieren mit den Absorptionsspektren der Chlorophylle. Im Bereich der sehr starken Rotbande fällt der MLS-Beitrag bis zu Null bei 670-680 nm ab, und im Bereich 750-800 nm steigt der bis zu 60 und 80 % für das Blattgewebe und für die Adern. Die entwickelte Methodik hat eine allgemeine Bedeutung und ist somit für die Analyse der Spektren von inhomogenen, stark streuenden Objekte anwendbar.

Die DSA Methode ermöglicht ebenfalls der Aufhellungseffekt von Seitenadern im Bereich der Absorptionsbanden des Chlorophylls zu quantifizieren. Dies geschieht durch einen Aufhellungsfaktor $\alpha(\lambda) = T_A / T_G$, der als das Verhältnis der Durchsichtigkeit T_A der feinen hellsten Adern zu der mittleren Transmission des Blattgewebes T_G ausgewertet werden kann. Das Integralsignal der hellsten Blattadern entspricht die hellen Densitogramm-Kante im Bereich der hohen Transmission. Die Spektralkurven des Aufhellungsfaktors $\alpha(\lambda)$ für die Adern der Tabak und Rizinus Blätter sind auf der Abb.6.3.8 gezeigt. Die maximalen Werte erreicht $\alpha(\lambda) = 12-17$ im Bereich der Chlorophyllbande bei 680 nm.

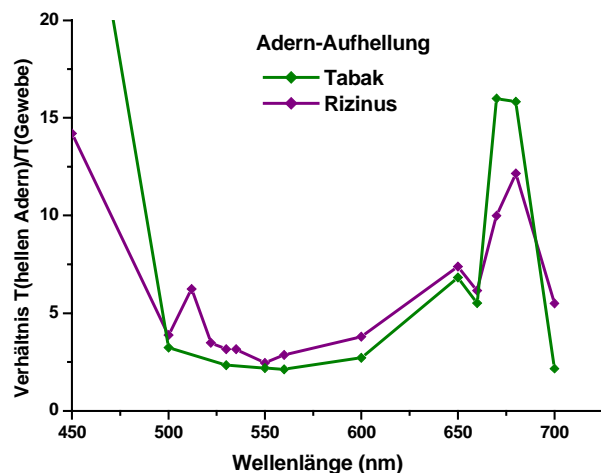


Abb.6.3.8: Spektralkurven des Aufhellungsfaktors $\alpha(\lambda)$ für die Adern von Tabak und Rizinus Blättern.

Raumspektren der Pflanzenblätter im VIS Bereich

Wie bereits erwähnt wurde, ermöglicht die DSA Methode die konventionellen Spektren und die Raumspektren zu ermitteln. Die erste wurden nach der Lage der Maxima von Densitogramm-Banden an der Spektralskala ausgewertet. Diese Spektren charakterisieren die Zustände der Moleküle in verschiedene Zeitmomente. Die von uns zum ersten Mal erhaltenen Raumspektren kennzeichnen die räumliche Homogenität der Spektralcharakteristiken der ausgewählten Teilmenge von Objektpunkten. Die Raumspektren wurden nach der Höhe (Intensität) der Densitogramm-Maxima das heißt nach der Anzahl der Bildpixel von gleichen Grauwerten (statistische Erfassung) ermittelt. Diese Darstellungsweise ermöglicht verschiedene optische Charakteristika der Pflanzenblätter und ihren Einzelteilen spektral zu extrahieren und zu analysieren.

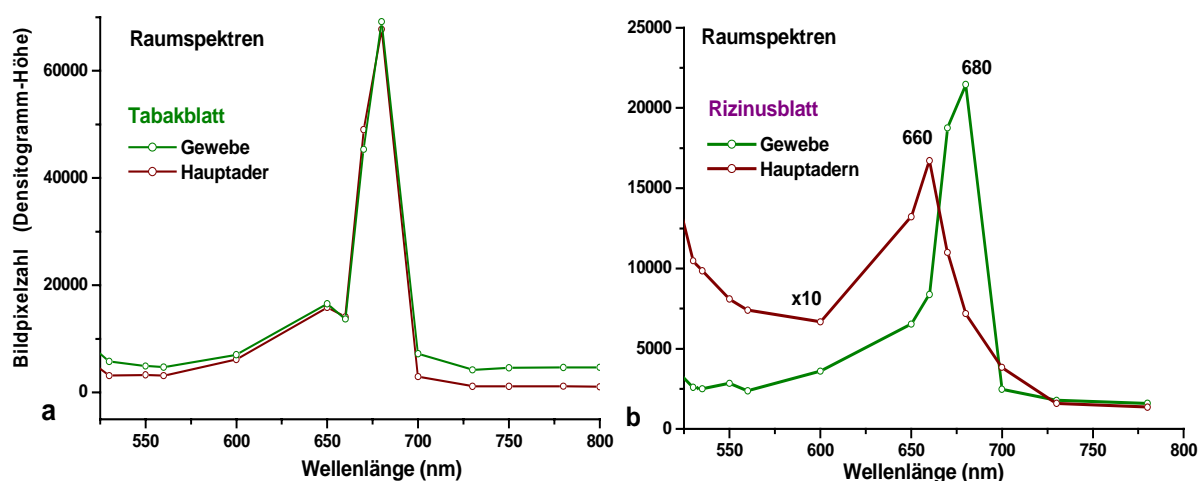


Abb. 6.3.9: Raumspektren von Adern und Gewebe der Tabak (a) und Rizinus Blätter (b) für VIS Spektralbereich. Raumspektren charakterisieren die räumliche Homogenität der Absorptionwerte für Blattgewebe und Adern.

Die Raumspektren von Gewebe und Adern der Tabak und Rizinus Blätter für VIS Spektralbereich sind in Abb.6.3.9 dargestellt. Im Vergleich zu den konventionellen Absorptionsspektren haben sich die Raumspektren als mehr schmalbändiger erwiesen. Die Raumspektren weisen die charakteristischen Banden der Chlorophylle auf. Außerdem unterscheiden sich die Raumspektren von Adern und Gewebe des Rizinus Blattes, im Gegenteil zu dessen vom Tabak Blatt. Es spricht dafür, daß im Gegenteil zum Tabak Blatt hat ein Rizinus Blatt die größere Unterschiede in der Adern- und Gewebestruktur sowie in der Chlorophyllverteilung über die Blattfläche.

Fazit

- Zum Erzen Mal wurden der Spektralbilder von Pflanzenblättern im Spektralbereich der Chlorophyllabsorption erhalten und damit die Chlorophyllverteilung über die Blattfläche visualisiert und analysiert wurde.
- Die entwickelten Methoden der DSA und des "Eintauchens" der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund ermöglichen, die Istwerte der Absorptionsbanden vom Chlorophyll in Pflanzenblättern zu bestimmen. Es wurde festgestellt, daß die realen Chlorophyll-Absorptionsbanden von Blattgewebe und Adern nahezu gleich groß sind.

Kapitel 7

Bildgebende NIR-Spektroskopie von Pflanzenblättern Blattwassergehalt und -Zustand

7.1. Spektroskopie und Visualisierung des Blattwassers

Um Wasser in Pflanzenblätter zu untersuchen, wurden verschiedene physikalische Methoden verwendet: Kalorimetrie, magnetischer Kernresonanz (NMR), dielektrische und infrarote Spektroskopie (Kapitel 3.4.3). Diese Methoden eignen sich zwar für Untersuchungen des lokalen oder gesamten Blattwassergehaltes, aber können keine Aussage bezüglich des Wasserzustandes und der Wasserverteilung im Blatt geben. Eine positive Seite der Methode der Schwingungsspektroskopie ist es, daß sie den Wasserzustand auf dem Niveau des Zustandes der Atom- und Molekülverbindungen beschreibt. NIR Spektren von Wasser besitzen einige Schwingungsbanden (Obertöne und Kombinationstöne verschiedener Ordnungen). Die Spektralanalyse der Wasserbanden erlaubt eine glaubwürdige und vielseitige Information über den Zustand und Gehalt von Wasser zu erhalten.

In den letzten Jahre wurde für Wasser die Erscheinung des "Dualismus" festgestellt: eine gleichzeitige Erscheinung des Einteilchen- und Kollektivverhaltens der Wassermoleküle. Die individuelle Einteilchen-Bewegung der Moleküle zeigt sich in der Translations- und Rotationsdiffusion der Moleküle, die meistens mit Hilfe der oben genannten Methoden untersucht wurden. Diese Eigenschaften sind durch die Fließfähigkeit des Wassers bestimmt. Die neue nichtinvasive Untersuchungsmethode eines wäßrigen Mediums wurde nach der Entdeckung von kollektiven Schwingungsmoden des Netzes der Wasserstoffbrücken von Wasser möglich [Korniyenko 1999]. Die kollektiven Schwingungsbanden wurden in den Raman und IR Spektren registriert. Eine Berücksichtigung der kollektiven Eigenschaften von Wasser erlaubt den ganzen Spektralbereich des Wassersystems in einem Pflanzenblatt zu erfassen. Dank der zwischenmolekularen Wechselwirkungen im kondensierten Zustand eines Mediums sind die Anregungen auf den einzelnen Molekülen nicht lokalisiert, wie es früher angenommen wurde, sondern werden zwischen den Teilchen durch wellenähnlichen Moden übertragen [Korniyenko 2000; Korniyenko 2002].

Das dreiatomare Wassermolekül H_2O hat im Gaszustand drei normale $\nu_{1,2,3}$ Schwingungen (Kapitel.2.2.4). Zwei dieser Schwingungen $\nu_{1,3}$ sind mit einer Längenveränderung zwischen den Wasserstoff- und Sauerstoffatomen verbunden und heißen Valenzschwingungen. Die Deformationsschwingung ν_2 entspricht der Veränderung des Winkels zwischen den O und H Atomen im Wassermolekül. Symmetrische und asymmetrische normale Schwingungen der Wassermoleküle im Damp fzustand können gut unterschieden werden und ihre Frequenzen sind $\nu_1=3652\text{ cm}^{-1}$ bzw. $\nu_3=3750\text{ cm}^{-1}$. Bei der Entstehung eines Netzes der Wasserstoffbrücken werden die Frequenzen der Valenzschwingungen $\nu_{1,3}$ wesentlich kleiner und transformieren sich in eine kollektive Mode ν_{OH} , die der Veränderung der Verbindungslänge zwischen den Wasserstoff- und Sauerstoffatomen im Netz der Wasserstoffbrücken entspricht. In den Schwingungsspektren (Raman und IR Spektren) wird eine breite Bande dieser Mode im Spektralbereich von $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ mit einem Maximum bei $\nu_{\text{OH}}=3420\text{ cm}^{-1}$ (2942 nm) beobachtet. Gleichzeitig wird die Deformationsschwingung der Wassermoleküle in die Deformationsmode ν_2 des Gitters der Wasserstoffbrücken umgewandelt. Das Bandenmaximum der Deformationsmode für flüssiges Wasser liegt bei $\nu_2=1642\text{ cm}^{-1}$ ($6\text{ }\mu\text{m}$). Diese Mode hat eine kleinere Halbwertsbreite und Intensität im Vergleich zur

Valenzbande. Der Wasserzustand ändert sich je nach Kräften zwischen den Wassermolekülen, der Topologie der Verbindungen im Wasserstoffbrücken-Netz und den Wechselwirkungen mit den organischen Molekülen. Der energetischen Wasserzustand (EWZ) kann durch das spektrale Verhalten der Schwingungsmoden untersucht werden.

Alle fundamentalen Schwingungen, ihre Obertöne und Kombinationstöne sind nach den Auswahlregeln für die Symmetriegruppe C_{2v} des Wassermoleküls erlaubt und werden in den Raman und IR Spektren beobachtet (Abb.7.1.1). Im Spektralbereich der fundamentalen Moden des Wassers ν_{OH} wird deutlich auch der Kombinationston der Deformationsmode ν_2 mit der niederfrequenten Gittermode $\nu_G=460\text{ cm}^{-1}$ (Spektralbereich $2100\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$) beobachtet. Diese Mode heißt auch Librationsmode und entspricht den koordinierten Drehoszillationen der Wassermoleküle. Im Raman Spektrum wird eine weitere Translationsmode niedrigerer Frequenz im Spektralbereich von $180\text{-}270\text{ cm}^{-1}$ registriert, die den kollektiven Quer- und Längs-Verschiebungen der Moleküle bezüglich der Richtung der Wellenausbreitung entspricht.

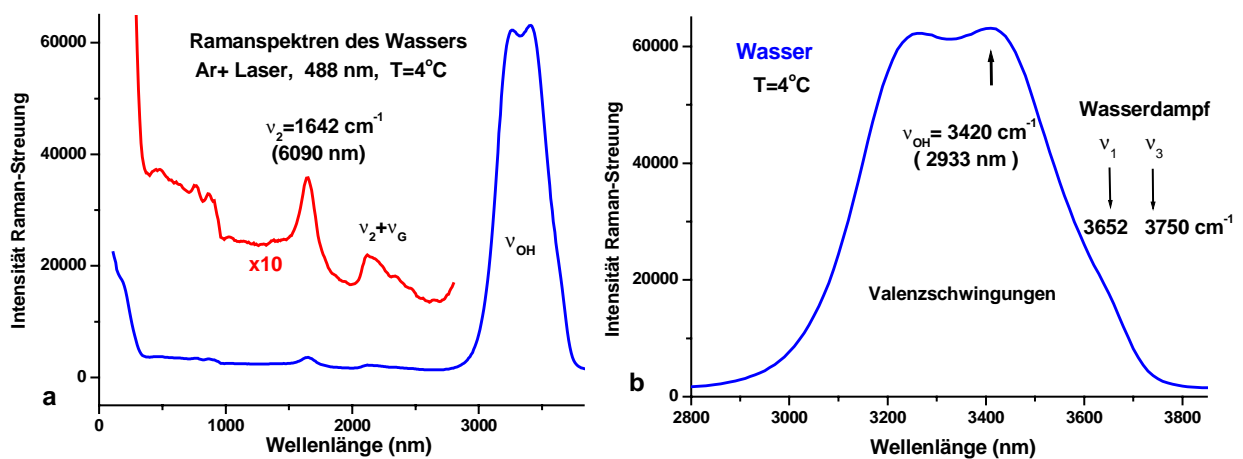


Abb.7.1.1: Raman Spektrum von Wasser im Spektralbereich der Valenzschwingungen.

Die Methode der Schwingungsspektroskopie kann sowohl für die Bestimmung des Wassergehaltes als auch der Wasserzustände angewendet werden. Die Kompliziertheit dieser Aufgaben ist durch ungenügende Kenntnisse der Entstehungsmechanismen von breiten Schwingungsbanden im Spektrum von flüssigem Wasser erklärt. Die zusätzlichen Schwierigkeiten für Wasser in stark streuenden inhomogenen Medien sind durch den Einfluß der Mehrfachlichtstreuung bedingt. Die MLS führt zu einer Verringerung des registrierten Signals und zugleich zu einer Verstärkung der Absorptionsbanden wegen der Vergrößerung der effektiven Weglänge des Lichtes in heterogenen Medien.

In dieser Arbeit zusammen mit Dr. M. Korniyenko (Tarasa Schewtschenko Universität, Kiew, Ukraine) wurden innovative Methoden entwickelt, die spektrale Untersuchung des Wassers in heterogenen Medien ermöglichen. Für die Untersuchung des Wassers in Pflanzenblättern wurden sowohl neue physikalische Vorstellungen und innovative (nicht konventionelle!) Methoden der Bildverarbeitung als auch moderne technische Möglichkeiten bildgebender Spektroskopie mittels CCD-Kameras im VIS- und NIR-Spektralbereich ($400\text{-}1700\text{ nm}$) verwendet. Es wurden drei spektrale Serien der Obertöne $n\nu_{OH}$ und der Kombinationstöne $n\nu_{OH} + \nu_{2,G}$ mit der Teilnahme der Deformations- ν_2 und Gittermoden ν_G analysiert. Eine ausführliche Profilbilder der Wasserverteilung über die Blattfläche kann so ermittelt werden. Dabei wurden die MLS-Effekte und insbesondere die Tatsache berücksichtigt, daß die Absorptions- und Streuprozesse nicht additiv sind. Dies hat uns ermöglicht, die Istwerte der Wasser-absorptionsbanden und effektive Dicken von Wasser (in mm oder μm) zu ermitteln. Zum ersten Mal wurden

einige diskrete Wasserzustände in den Pflanzenblättern entdeckt, die die wesentliche Unterschiede in den Schwingungsspektren zeigen. Größtenteils sind diese Unterschiede im Spektralbereich der Obertöne und der Kombinationstöne zu finden. Es wurden einzigartige Methoden für die Bestimmung des quantitativen Gehaltes verschiedener Wasserzustände in den Pflanzenblättern entwickelt. Ebenso wurde eine Möglichkeit des Studiums der zeitlichen Dynamik dieser Wasser-zustände demonstriert und eine Transformation der Wasserzustände bei physiologischen Prozessen festgestellt.

7.1.1. Spektrale Serien der Schwingungsmoden von Wasser

In der vorliegenden Arbeit wurden die Obertöne und Kombinationstöne höherer Ordnung in den Schwingungsspektren des Wassers in Pflanzenblättern gezielt untersucht. Dafür sind folgende Gründe zu nennen. Wegen einer starken Wasserabsorption können die Pflanzenblätter im Spektralbereich der Grundmoden ν_{OH} und ν_2 nicht untersucht werden, weil diese Moden in Blattspektren übersättigt sind. Um die Grundmoden zu registrieren, sind Wasserprobe einer Dicke von 2-20 μm nötig. Mithilfe der Spektralanalyse der Banden zweiter Ordnung $\nu_{OH}+\nu_2$ und $2\nu_{OH}$ bei 1930 und 1450 nm konnten die Wasserproben einer Dicke von 200 μm bis 1 mm untersucht werden, was auch mit der Blattdicke übereinstimmt. Die typische Dicke der untersuchten Tabak und Rizinus Blätter ist von 150-300 μm groß. Deshalb kann das Blattgewebe im Spektralbereich der schwachen Wasserabsorptionsbanden zweiter Ordnung analysiert werden. Für die Spektralanalyse der 2-5 cm dicke Pflanzengewebe können die Absorptionsbanden dritter und höherer Ordnungen benutzt werden. Dies ermöglicht die wassergesättigten Blätter der sukkulenten Pflanzen zu untersuchen.

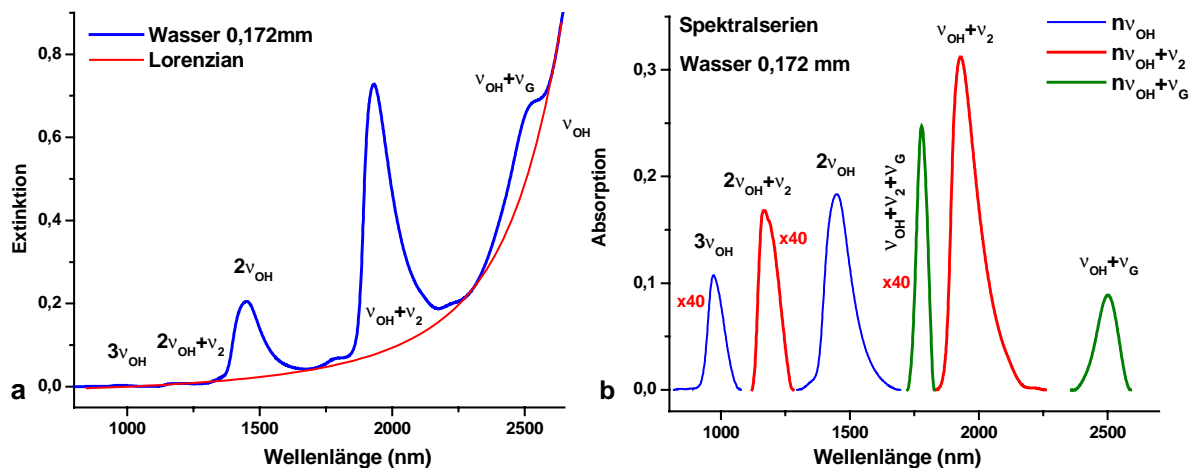


Abb. 7.1.2: Extrahierung der Wasser Absorptionsbanden aus Extinktionsspektrum (a). Spektralserien der Wasserbanden: Obertöne $n\nu_{OH}$ und Kombinationstöne $n\nu_{OH} + \nu_2, \nu_G$. (b).

Die höheren Schwingungsmoden $3\nu_{OH}$, $4\nu_{OH}$ können Struktureigenschaften des Wassers effektiv widerspiegeln. Spektralbereich der Überlappung von hochfrequenten Schwingungsmoden (Wasser) und langwelligen Elektronenbanden (organische Moleküle) ist von großem physikalischen Interesse, denn hier neue Effekte auftreten könnten. Es ist besonders für Wasser in Pflanzenblättern interessant, weil der 3. Oberton $4\nu_{OH}$ von Wasser (720-740 nm) mit dem Elektronenzustand des Aggregat-Chlorophylls (735 nm) in Resonanz kommt.

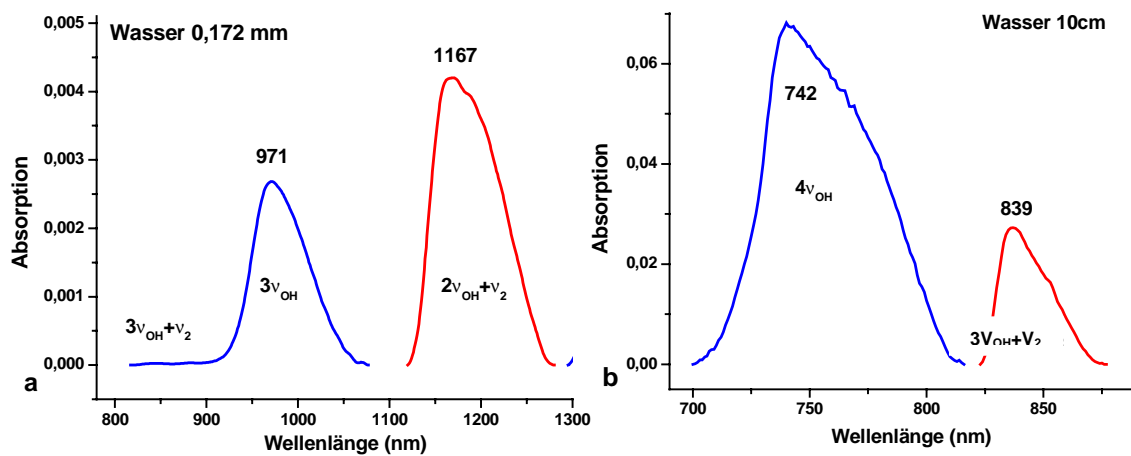


Abb.7.1.3: Vergleich von Wasserabsorptionsbanden der 3. (a) und 4. Ordnung (b).

Die Spektralmethoden der Fernerkundung spielen für eine Abschätzung des Zustandes der Vegetation eine immer größere Rolle. Aufgrund der Undurchsichtigkeit der Atmosphäre in IR-Spektralbereichen der starken Wasserbanden der 2. Ordnung bei 1460 und 1930 nm können bei der spektralen Fernerkundung nur schwächere $3v_{OH}$ Absorptionsbanden bei 970 nm in Reflexionsspektren gemessen werden. Wie bekannt und wie auch unsere spektrale Untersuchungen zeigen, unterscheiden sich die Reflexionsspektren von der Ober- und Unterseite des Blattes voneinander. Dazu noch geben die Reflexionsmessungen eine Information vorwiegend nur über die obere Schichte des Blattgewebes. Deshalb sind die Transmissionsspektren für die Ermittlung der wahren Absorptionsspektren vom gesamten Wassergehalt in Pflanzenblättern bevorzugt.

Zuerst wurden die spektralen Gesetzmäßigkeiten der NIR-Absorption von destilliertem Wasser und Wasser verschiedener Pflanzenblätter im Spektralbereich von 700 bis 3000 nm untersucht. Dabei wurden die Schwingungsbanden der 2., 3. und 4. Ordnung analysiert. Dafür wurden das UV-Vis-NIR Spektrometer 500 SCAN (175-3300 nm), das HP 8453 Spektrometer (190-1100 nm) sowie ein Fiber Optic Miniaturspektrometer S2000 (190-1000 nm) verwendet.

Vor der Spektralanalyse der Absorptionsspektren vom Blattwasser, wäre es natürlich wichtig diese für Wasserproben im Detail zu untersuchen. Dafür wurden die Spektren von destilliertem Wasser im Spektralbereich von 700 bis 2600 nm studiert. Für die Extrahierung der Wasserabsorptionsbanden der Obertöne und der Kombinationstöne aus dem Untergrund der starken hochfrequenten Bandenflanke der fundamentalen Valenzmode bei 2920 nm wurde folgende Methode verwendet. Die Bandenflanke der Valenzmode wurde durch eine Lorenzkurve approximiert. Dafür wurden die Referenzpunkte im Spektralbereich zwischen den Wasserabsorptionsbanden benutzt (Abb.7.1.2a). Für die Rechtmäßigkeit dieser Approximation spricht die Tatsache, daß mittels dieser Methode das Maximum der Valenzmode bei 2960 nm ermittelt wurde, das mit der zulässige Abweichung dem Istwert entspricht (Tab.7.1.1).

Die Spektralen Serien der extrahierten Banden für destilliertes Wasser sind in Abb.7.1.2b und 7.1.3 dargestellt. Dabei wurden die schwachen Banden durch die Multiplikation vergrößert. Die Wellenlängen der Maxima von Wasserbanden (in nm) sind in Tabelle 7.1.1 aufgelistet. Im Spektralbereich der Obertöne und Kombinationstöne von Wasser können drei Serien der Spektralbanden unterschieden werden:

1. Serie der Obertöne der Valenzmode $n\nu_{\text{OH}}$;
2. Serie der Kombinationsbanden der Deformationsmode $n\nu_{\text{OH}} + \nu_2$;
3. Serie der Kombinationsbanden der Gittermode ν_G .

n	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4
n ν_{OH}	2933	1449	971	742
n $\nu_{\text{OH}} + \nu_2$	1930	1169	839	660

Tabelle 7.1.1: Wellenlänge (in nm) der Maxima der Absorptionsbanden von verschiedenen Serien für destilliertes Wasser.

Für die 1. Serie der Obertöne ist das größte Zunahme der Halbwertsbreite der Spektralbanden charakteristisch. Für die 1., 2. und 3. Obertöne von Wasser beträgt die entsprechende Halbwertsbreite 544, 728 und 979 cm^{-1} . Für die 2. und 3. Serie der Kombinationsbanden sind kleinere Halbwertsbreiten charakteristisch. Zum Beispiel ist die Halbwertsbreite für die $3\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ Mode dem Wert von 366 cm^{-1} und für die $2\nu_{\text{OH}} + \nu_G$ Mode von 157 cm^{-1} gleich. Die Intensität der Banden der ersten Spektralserie sinkt mit zunehmender Ordnung langsamer als die der Banden der 2. und 3. Serien. Infolge dessen ist der Oberton $4\nu_{\text{OH}}$ in 3fach intensiver als die Bande des Kombinationstones $3\nu_{\text{OH}} + \nu$ (Abb.7.1.3b). In den Paaren der Banden der 2. Ordnung ($2\nu_{\text{OH}}$ und $\nu_{\text{OH}} + \nu_2$) und der 3. Ordnung ($3\nu_{\text{OH}}$ und $2\nu_{\text{OH}} + \nu_2$) haben die größte Intensität die Kombinationsbanden der Deformationsmode ν_2 (Abb.7.1.3a). Man sollte die Intensitätsverteilung der hohen Obertöne und Kombinationstöne berücksichtigen, da diese für das Verständnis der Eigenschaften des Blattwassers wichtig ist. Wie es im weiteren gezeigt wird, ist das Verhältnis der Intensität und Lage von Absorptionsbanden ein "Detektor" des energetischen Wasserzustandes (Kapitel 7.3).

Für die quantitative Bestimmung des Wassergehaltes in Pflanzenblättern wurden spezielle Spektralmethode ausgearbeitet. Spektrale Untersuchungen des Blattwassers sollten im Spektralbereich der schwachen Obertöne und Kombinationstöne durchgeführt werden. Zuerst wurden die Absorptionsspektren für die Wasserproben verschiedener Dicke in den Küvetten von 40 μm bis 10 cm untersucht. Die Küvettendicke wurden variiert, um diese mit der Dicke der untersuchten mesophyten (100-300 μm) und sukkulenten (0,5-5 mm) Blättern vergleichen zu können. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die Form der Wasserabsorptionsbanden wenig mit der Wasserschichtdicke d ändert. Die optischen Dichte

$$D = \lg(I_0/I) = k(\lambda)d$$

ändert sich linear mit der Wasserschichtdicke d . Der Absorptionskoeffizient $k(\lambda)$ hängt mit dem spezifischen Absorptionskoeffizienten $\alpha(\lambda)$ wie folgt zusammen

$$\alpha(\lambda) = \ln 10 k(\lambda) = 2,303k(\lambda).$$

Es wurde festgestellt, daß die Banden der 2. Serie der Kombinationstöne $n\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ zu den Wasserzustand am empfindlichsten sind. Intensität der $2\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ Banden (1180 nm) vom Blattwasser steigt ungefähr um 2fache im Vergleich zum destillierten Wasser, und für die Banden höherer Ordnung können diese Veränderungen noch größer sein. Für alle Banden der Obertöne und der Kombinationstöne wurden die Werte der Absorptionskoeffizienten für die effektive 1mm dicke Wasserschicht berechnen. Diese Koeffiziente wurden zur Ermittlung der Profilbilder von Wasser in verschiedenen Pflanzenblättern verwendet (Kapitel 7.2).

7.1.2. Spektrale Untersuchungen des Blattwassers

Um die Untersuchungen der räumlichen Verteilung von Wasser in Pflanzenblättern mittels der bildgebenden Spektroskopie zu ermöglichen, wurde zuerst eine Spektralanalyse verschiedener Pflanzenblätter durchgeführt. Es wurden die Blätter von Rizinus, Tabak und von sukkulenten Pflanzen (Kalanchoe, Kaktus, Aloe) untersucht. Die Blätter der sukkulenten Pflanzen enthalten mehr Wasser im Vergleich zu den anderen verfügbaren Blättern und waren für die Entwicklung der Methodik der spektralen Messungen von Blattwasser besonders geeignet. Die Abb.7.1.4 zeigt in Übersichtweise die Transmissionsspektren der Rizinus und Tabak Blätter und einiger sukkulenter Pflanzen. Die Absorption der Blätter im VIS-Spektralbereich des Spektrums ist hauptsächlich durch das Chlorophyll (Maxima bei 430 und 680 nm) und im NIR-Spektralbereich durch das Wasser bedingt. Die Rizinus und Tabak Blätter sind in breitem Spektralbereich von 700 nm (Absorptionsrand von Chlorophyll) bis zu 2500 nm (fundamentale Mode der Wasserabsorption) teilweise durchsichtig. Obwohl die Wasserabsorption im Spektralbereich der Obertöne relativ schwach ist, wird durch das Rizinus oder Tabak Blatt weniger als 1% der einfallenden Infrarotstrahlung transmittieren. Noch geringer ist die Durchsichtigkeit der Blätter von sukkulenten Pflanzen sowie von dickeren Blattadern, dabei beträgt Transmission nur 0,1-0,5%. Die Blätter der sukkulenten Pflanzen und dicke Adern der mesophyten Blätter sind nur im Spektralbereich des 2. Obertones $3\nu_{OH}$ bei 971 nm durchsichtig. Dies wird durch die übersättigte Absorption der $2\nu_{OH}$ Mode (1451 nm) der 1-4 mm dicken sukkulenten Blätter bedingt.

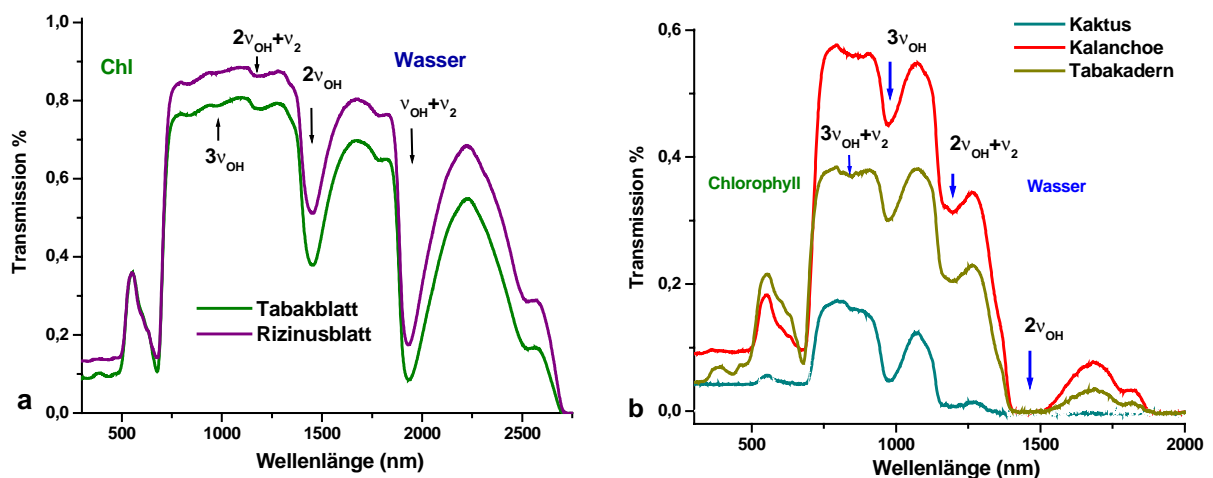


Abb.7.1.4: Transmissionsspektren von Blättern: Mesophyte (a) und Sukkulente (b).

Im Spektralbereich der Durchsichtigkeit von mesophyten Blättern 700-2500 nm treten die Wasserabsorptionsbande in der Form einer "Delle" auf. Wie es aus Abb.7.1.4 ersichtlich ist, sind die $3\nu_{OH}$ und $2\nu_{OH}+\nu_2$ Banden ziemlich schwach. Ihre Größe ist mit der Rauschenbahn vergleichbar und ohne eine Glättung sind sie für die quantitative Bestimmung des Wassergehaltes im Blatt kaum geeignet. Für die quantitative Bestimmung des Wassergehaltes in Rizinus und Tabak Blättern ist Spektralbereich des $2\nu_{OH}$ Obertones (bei 1450 nm) und $\nu_{OH}+\nu_2$ Kombinationstones bei 1930 nm besonders passend. Für die sukkulenten Blätter muß man solche Untersuchungen im Spektralbereich des $3\nu_{OH}$ Obertones bei 970 nm durchführen. Darin besteht der wesentliche Unterschied der Spektralanalyse dieser Blattarten. Den größten Beitrag zur Reduzierung der Transmission trägt die MLS im Blattgewebe bei, was im weiteren gezeigt wird.

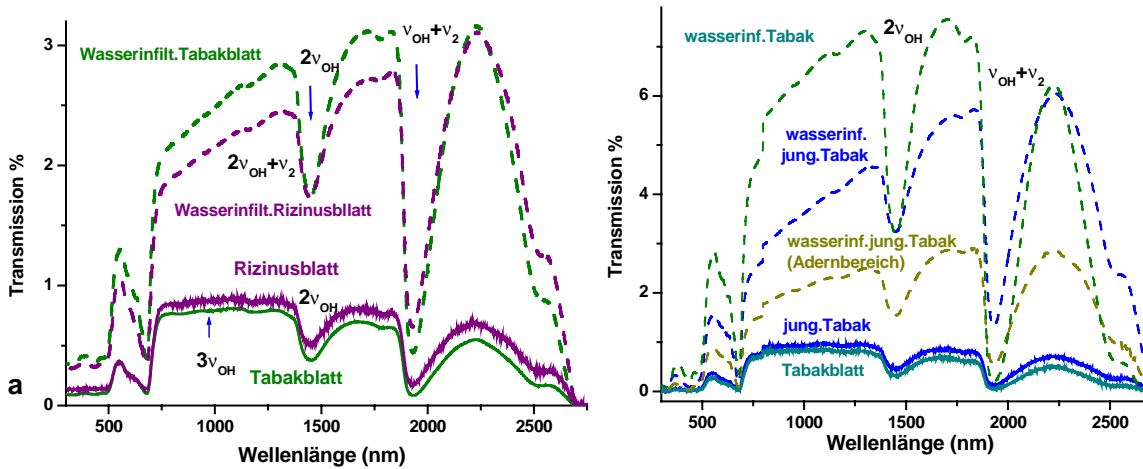


Abb.7.1.5: Transmissionsspektren von nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Pflanzenblättern: Vergleich der Spektren von Tabak und Rizinus (a) sowie von jungen und reifen Tabak Blättern (b).

Eine wesentliche Erhöhung der Durchsichtigkeit von Rizinus und Tabak Blättern kann mittels der Wasserinfiltration erreicht werden. Die Durchsichtigkeit des Blattes wird nach der Wasserinfiltration größer, weil die Interzellulare mit Wasser gefüllt werden und damit die Inhomogenität des Blattes vermindert wird, was führt zur Reduzierung der MLS im Blattgewebe. Der Wassergehalt und der Grad der Wasserinfiltration wurden mittels der gravimetrischen Methode vor und nach der Wasserinfiltration und auch nach dem vollständigen Austrocknen bestimmt. In Abb.7.1.5a sind die Transmissionsspektren von wasserinfiltrierten Rizinus und Tabak Blättern dargestellt. Abb.7.1.5b zeigt ein Vergleich der Transmissionsspektren von den jungen und reifen Tabak Blättern. Bei der 20-35% Wasserinfiltration von Rizinus und Tabak Blättern steigt ihre Durchsichtigkeit bis zu 3%. Bei der 78% Wasserinfiltration des reifen Tabak Blattes steigt seine Durchsichtigkeit bis zu 7-8%.

Die jungen Tabak Blätter sind durchsichtiger als die reifen, da der Beitrag der MLS geringer ist. Es könnte auch durch ihre kleinere Dicke und eine größere Homogenität des Blattgewebes bedingt sein. Die jungen Tabak Blätter können nur bis zu 20% mit dem Wasser infiltriert werden. Deswegen beträgt die Durchsichtigkeit der jungen wasserinfiltrierten Blätter 5-5,5%, was im Vergleich zu den reifen Blättern geringer ist. Es sollen auch die Ähnlichkeit der Transmissionsspektren von jungen und reifen wasserinfiltrierten Blättern im Spektralbereich von 1900 bis 2750 nm und ihre signifikante Unterschiede im Spektralbereich von 700 bis 1800 nm betont werden. Die Durchsichtigkeit des jungen wasserinfiltrierten Tabak Blattes beträgt im Bereich der Hauptader weniger als 3%. Dies ist durch einen starken MLS-Betrag aufgrund einer größeren Aderdicke bedingt.

Abbildung 7.1.6a präsentiert das Extinktionsspektrum eines Tabak Blattes in breitem Spektralbereich. Wie aus diesem Spektrum ersichtlich ist, ist die Intensität der stärksten Wasserbanden $v_{OH}+v_2$ bei 1931 nm und $2v_{OH}$ bei 1451 nm mit den starken Chlorophyllbanden im VIS Bereich vergleichbar. Für die ausführliche Analyse der Wasserabsorptionsbanden von Pflanzenblättern sollten diese aus dem MLS-Untergrund in den Extinktionsspektren extrahiert werden. Solche Extrahierung der Absorptionsbanden von destilliertem Wasser aus der starken hochfrequenten Flanke der Valenzbande v_{OH} wurde im Kapitel 7.1.1 beschrieben. Aufgrund der komplizierteren Form des MLS-Untergrundes im Vergleich zu dieser Bandenflanke wurde die spektrale Kurve des MLS-Niveaus durch

ein Polynom 8. Ordnung approximiert (Abb.7.1.6b). Das approximierten MLS-Untergrund wurde von dem Extinktionsspektrum des Blattes abgezogen und damit die Absorptionsbanden des Blattwassers extrahiert wurden. Im weiteren wurden die auf solche Weise extrahierten Wasserabsorptionsspektren von Tabak und Rizinus Blättern betrachtet.

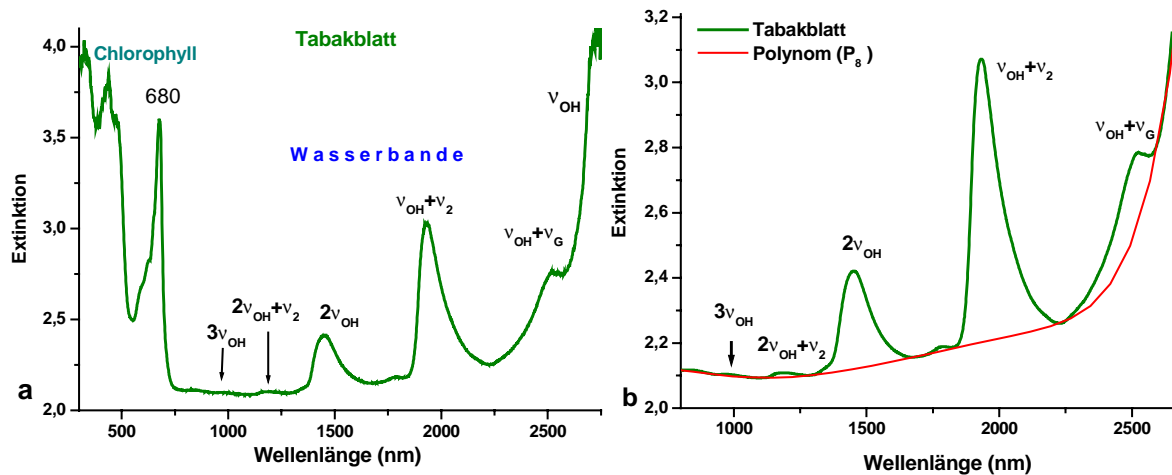


Abb.7.1.6: Extinktionsspektrum (a) und Extraktion der Absorptionsbanden (b) von Wasser eines Tabak Blattes.

Beim Vergleich der Absorptionsspektren von Blattwasser und destillierten Wasser ist es zweckmäßig die Normung der Spektralbanden im Bereich des stärksten Kombinationstones $\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ durchzuführen. Vor allem ist diese Absorptionsbande zur Veränderung des Wasserzustandes wenig empfindlich. Außerdem könnten die Spektralmessungen im Bereich der starken Bande mit dem kleinen Fehler gemacht werden. Solche Normung der Wasserbanden eines Tabak Blattes ist in Abb.7.1.7 gezeigt. Nach dem linearen Zusammenhang der Absorptionswerte des destillierten Wassers von der Küvettendicke wurden effektive Dicke der Wasserschicht ermittelt. Die effektive Wasserdicke entspricht einer Menge des destillierten Wassers, die das gleiche Absorptionsvermögen im Bereich der Absorptionsbande bei 1930 nm hat. Die effektive Wasserdicke wurde in Millimetern pro Einheitfläche des Blattes berechnet. Für das untersuchten Tabak Blatt hat sie sich gleich 239 μm erwiesen

Zum Vergleich wurde die effektive Wasserdicke des Tabak Blattes auch mit Hilfe der gravimetrischen Methode ermittelt und zwar, nach der Berechnung der Wassermenge im Blatt auf Einheit seiner Fläche als der Gewicht-Differenz des frischen und ausgetrockneten Blattes. Die auf solche Weise berechnete effektive Wasserdicke im Tabak Blatt war 247 μm gleich. Dies beweist, daß die Wassermenge in den Pflanzenblättern mittels der Spektralauswertung im Bereich der Wasserbanden $\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ und $2\nu_{\text{OH}}$ mit der ausreichenden Genauigkeit bestimmt werden kann.

Die starken Unterschiede der Absorptionsbanden des Blattwassers gegenüber zum destillierten Wasser wurden im Bereich der schwächeren Moden $3\nu_{\text{OH}}$, $2\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ und $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ beobachtet. Die Veränderungen der Intensität und der Frequenzen der höchsten Schwingungsmoden wurden für die Bestimmung der Wasserzustände in den Pflanzenblättern angewendet. Diese Fragen werden in den Kapitel 7.3. näher betrachtet.

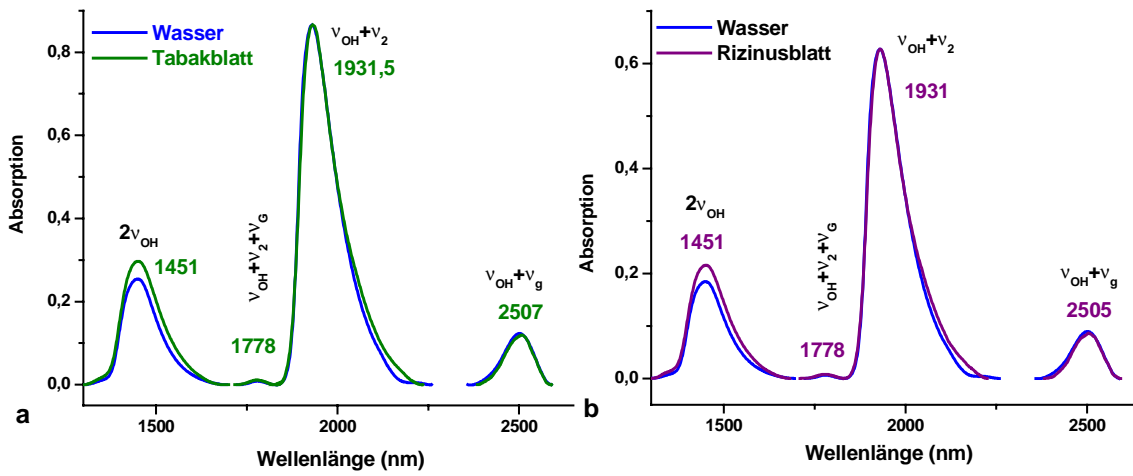


Abb. 7.1.7: Vergleich der Spektralbanden von destilliertem Wasser und Tabak(a) bzw. Rizinus Blatt.(b).

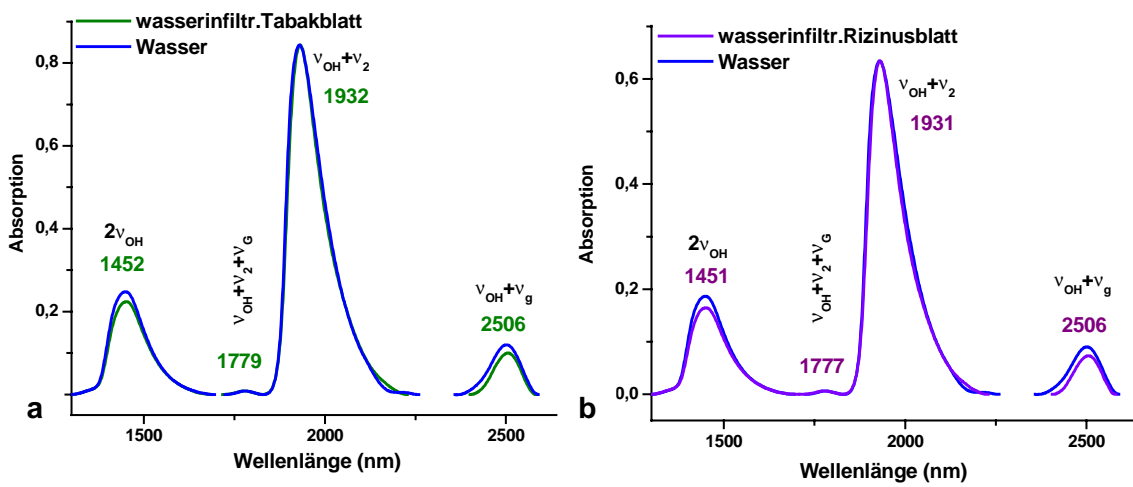


Abb. 7.1.8: Spektralbanden von destilliertem Wasser und wasserinfiltrierten Tabak (a) sowie Rizinus Blättern (b).

7.1.3 Bildgebende Spektroskopie des Blattwassers

Mittels der bildgebenden Spektroskopie wurde räumliche Verteilung der Spektralcharakteristiken von Blättern im NIR Spektralbereich der Wasserabsorption untersucht. Dadurch wurde es möglich, von der Analyse der integralen Spektralcharakteristiken des Blattwassers zur Analyse der räumlichen Verteilung des Wassers im Blatt überzugehen. Die Spektralbilder der Wasserverteilung in Blättern wurden mit Hilfe eines bildgebenden CCD Spektrometers (Kapitel 5.1) studiert. Die in vorliegender Arbeit entwickelten Methoden der Bearbeitung der Spektralbilder ermöglichten es, die Bilder der Transmission und Absorption des Blattwassers zu ermitteln.

Die verwendeten PixelFly Kamera (Spektralbereich 300-1050 nm) und Alpha NIR Kamera (900-1700 nm) machten eine Untersuchung der Blätter im Spektralbereich der Wasserbanden der Obertöne $4v_{OH}$, $3v_{OH}$ und $2v_{OH}$ bei 740, 970 und 1460 nm und der Kombinationstöne bei 850 und 1200 nm möglich. Als Beleuchtungsquelle wurde die räumlich homogene Strahlung einer Ulbricht Kugel mit vier Halogenlampen und einer stabilisierten Spannung von 10-20 W verwendet. Da die Beleuchtung homogen war, könnten die Effekte der Guerlichtdifusion des Lichtes im Blattgewebe nicht berücksichtigt werden. Um eine Sequenz der Spektralbilder aufzunehmen, wurde ein Satz der schmalbandigen Interferenz-Bandpaßfilter eingesetzt. Dabei wurden die Bandpaßfilter mit einer Durchlaßbande im Spektralbereich der Maxima und Minima der Wasserabsorptionsbanden benutzt. Bei den Aufnahmen mit der Alpha NIR Kamera im Spektralbereich von 900 bis 1700 nm wurden zwölf Bandpaßfilter (950, 980, 1000, 1050, 1100, 1200, 1300, 1420, 1460, 1500, 1600 und 1700 nm) angewendet. Bei den Messungen mit der PixelFly Kamera im Spektralbereich der Wasserbanden $3v_{OH}$ и $4v_{OH}$ 700-1050 nm wurden elf Bandpaßfilter (700, 730, 750, 780, 800, 850, 900, 950, 980, 1000 und 1050 nm) eingesetzt. Innerhalb der breiten Wasserbanden der Obertöne $2v_{OH}$ und $3v_{OH}$ wurden 6 Bandpaßfilter verwendet. Damit wurden die Form der Wasserabsorptionsbanden für das Gewebe und für die Adern von Blättern, der Verlauf der MLS-Spektren innerhalb der starken Absorptionsbande bei 1460 nm und die Raumspektren des Wassers in den Blättern getrennt untersucht. Zum Beispiel im Spektralbereich der $2v_{OH}$ Absorptionsbande wurden die Filter 1300, 1420, 1460, 1500, 1600 und 1700 nm verwendet, deren Bandbreite (15-20 nm) wesentlich schmäler als die Halbwertsbreite (510 nm) der studierten Wasserbande sind. Bei der Extrahierung der Wasserabsorptionsbanden aus den Extinktionsspektren wurde der Zusammenhang zwischen der MLS und Absorption berücksichtigt. Dies ermöglichte es, die Istwerte der Absorptionsbanden des Wassers für die Adern und das Blattgewebe zu ermitteln.

Um die Experimente zuverlässig und mit hoher Genauigkeit durchzuführen, wurde die CCD-Kamera sorgfältig justiert. Auch eine optimale Belichtungszeit des Kamerachips wurde ausgenutzt, um eine maximale Intensität der Spektralbilder zu haben. Um das Rauschen so klein wie möglich zu machen, wurde eine Sequenz von 16 Einzelbildern aufgenommen, die danach gemittelt wurden. Die Bilder der mittleren Abweichungen wurden ebenfalls berechnet.

Transmissionsbilder der Pflanzenblätter

Für jeden der Bandpaßfilter $F(\lambda_n)$ wurden Bilder des Pflanzenblattes $I(\lambda_n)$ sowie die Bilder der Beleuchtungsfeldes von der Ulbricht Kugel $I_0(\lambda_n)$ aufgenommen. Eine Bildverarbeitung wurde mit Hilfe der Software "Heurisko" durchgeführt. Mittels des speziell dafür geschriebenen Heurisko-Workspaces wurden die Transmissionsbilder $T(\lambda_n)=I(\lambda_n)/I_0(\lambda_n)$ ermittelt. Im folgenden werden die spektralen Transmissionsbilder für die Rizinus und Tabak Blätter in den Spektralbereichen der Maxima von Wasserabsorptionsbanden bei 980 und 1460 bzw. im Bereich des Wasserabsorptionsminimum zwischen diesen Banden bei 1100 nm dargestellt.

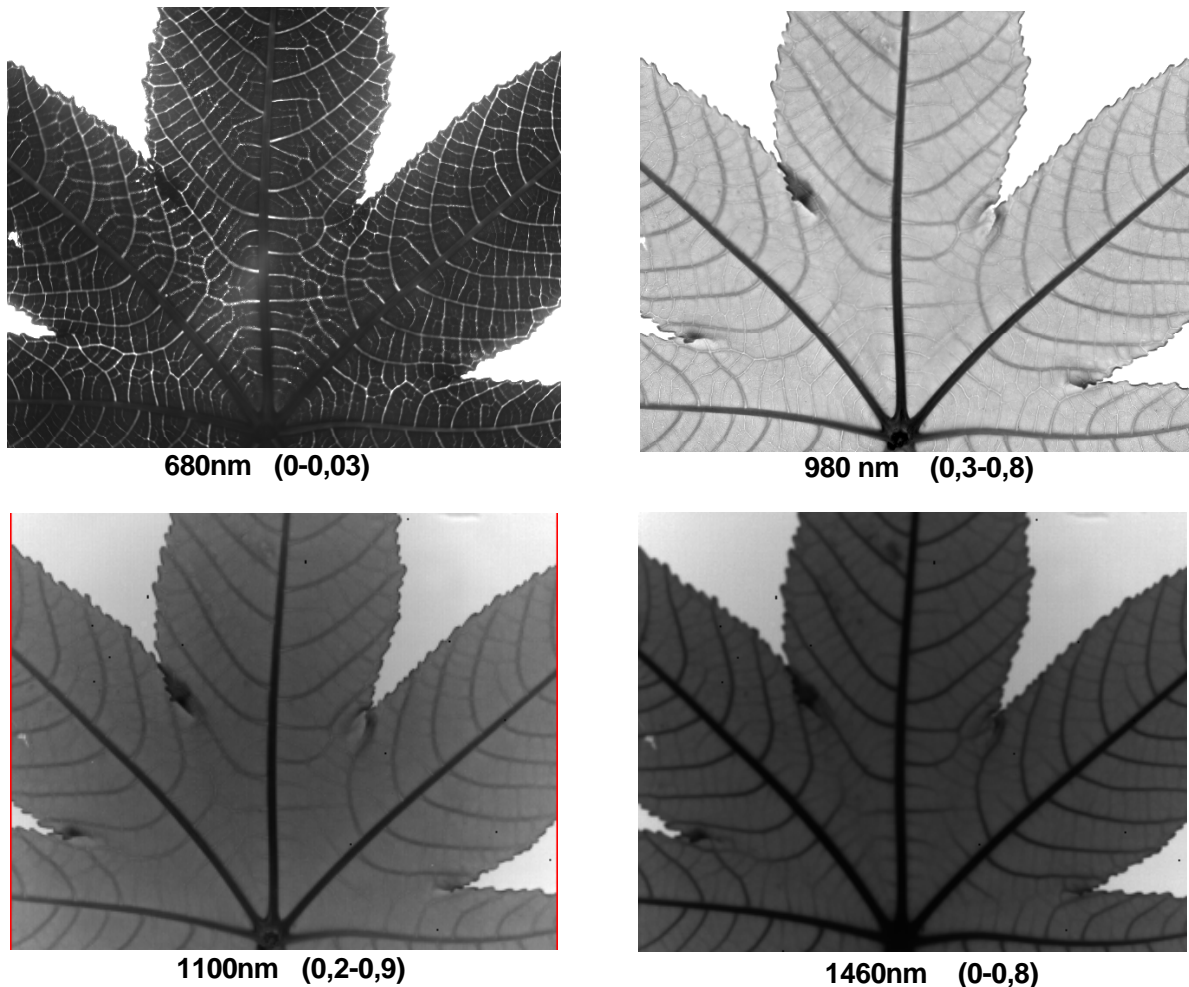


Abb.7.1.9: Transmission-Spektralbilder eines jungen Ricinus Blattes.

Die Transmissionsbilder $T(x, y)$ eines jungen Ricinus Blatt für die Wellenlängen 980, 1100 und 1460 nm sind in Abb.7.1.9. gezeigt. Neben den Wellenlängen sind die Wertbereiche der registrierten Transmission angegeben. Zwecks eines Vergleiches ist auch das Bild desselben Ricinus Blattes im Spektralbereich der Chlorophyllbande bei 680 nm gezeigt. Es sind wesentliche Veränderungen in den Bildern beim Übergang von den Absorptionsbanden des Chlorophylls zu den Absorptionsbanden des Wassers zu sehen. Im Spektralbereich vom Chlorophyll ist für kleine Adern der 3. Ordnung ein Effekt der Aufhellung zu beobachten. Beim Übergang zu der schwachen Absorptionsbande des Obertones $3\nu_{OH}$ (980 nm) werden die Hauptadern infolge des in ihnen vorhandenen Wassers dunkel. Die Seitenadern werden auch dunkel, aber in ihren zentralen Teilen wird ein Aufhellungseffekt beobachtet. Im Spektralbereich der stärkeren Wasserbande bei 1460 nm sehen das Blattgewebe ($T \sim 20\%$) und insbesondere die Adern ($T \sim 5\%$) dunkel aus.

In Abb.7.1.10 sind die Transmissionsbilder eines Tabak Feldblattes präsentiert. Eine Aufhellung der zentralen Kanäle von kleinen Adern und Seitenadern sowie der dunklen Kanäle der Hauptadern ist im Spektralbild bei 1100 nm sichtbar.

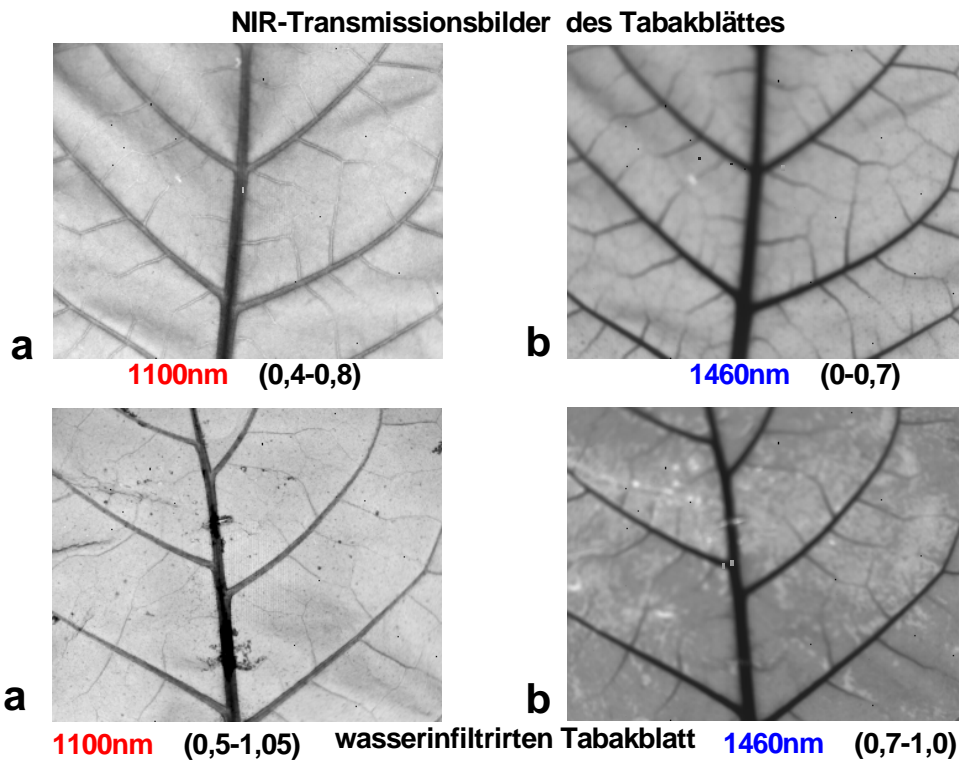


Abb.7.1.10: Transmission-Spektralbilder von nichtinfiltriertem (oben) und wasserinfiltriertem (unten) Tabak Feldblatt

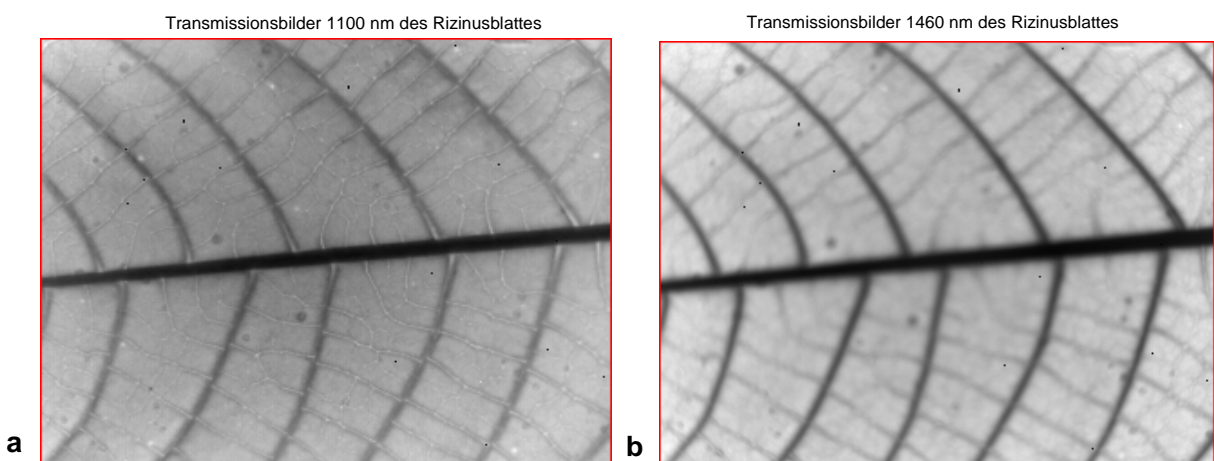


Abb.7.1.11: Transmission-Spektralbilder eines Rizinus Blattes bei 1100 nm (a) und bei 1460 nm (b).

Im Spektralbereich der Wasserabsorptionsbande bei 1460 nm sehen alle Adern wegen der Wasserabsorption dunkel aus. In dieser Abbildung sind ebenfalls die Spektralbilder

vom wasserinfiltrierten Tabak Blatt gezeigt. Im Spektralbereich 1100 nm wird die Aufhellung des Blattgewebes infolge einer Abschwächung des MLS-Einflusses beobachtet. Gleichzeitig verdunkeln sich die zentralen Teile von kleinen Adern und sogar von Seitenadern, die mit dem Wasser gesättigt werden. Im Spektralbereich der Wasserbande bei 1460 nm verdunkelt sich auch das Blattgewebe wegen der Auffüllung der Interzellularen mit Wasser. In Abb.7.1.11 sind die Transmissionsbilder des reifen Rizinus Blattes zu sehen. Die Bilder sind im optimalen für die Betrachtung Grauwertbereich dargestellt. Im Spektralbereich 1100 nm ist die Aufhellung der zentralen Kanäle kleiner Adern sichtbar.

7.1.4. Densitogramm-Spektral-Analyse der Spektralbilder

Die Spektralanalyse einer Sequenz der Transmissionsbilder $T(\lambda_n)$ wurde mit Hilfe der entwickelten Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse (DSA) gemacht. Die DSA Methode ist ein Instrumentarium für die quantitative Bearbeitung der Spektralbilder und für die Ermittlung und Auswertung der spezifischen Absorptionsspektren (Kapitel 5.1). Spektrale Densitogramme geben die Statistik der Grauwerte-Verteilung über das gesamte Bild wieder. Man kann sagen, daß die Densitogramme die Spektralbilder (räumlichen Spektralcharakteristika) der Blätter mit den Spektren von ganzem Blatt bzw. von seinen Strukturelementen verbinden. In diesem Kapitel werden Unterschiede in den Wasserspektren von Blattgewebe und Adern analysiert.

In Abb.7.1.12 ist ein Vergleich der Densitogramme vom jungen und reifen Rizinus Blatt für die charakteristischen Wellenlängen bei 1100 und 1460 nm dargestellt. Die Hauptbanden der Densitogramme entsprechen dem Blattgewebe und die schwachen Maxima im Spektralbereich der niedrigen Transmissionswerten den dunklen Adern. Mehrere Peaks in den Banden der Densitogramme weisen auf eine Inhomogenität der strukturellen Elemente des Blattes hin. Die Lage der Maxima von Densitogrammen zeigt, daß Gewebe des jungen Rizinus Blattes um mehr als das 1,5fache ($T=43\%$) durchsichtiger im Vergleich zum reifen Blatt ist und seine Adern ungefähr um den Faktor 2 transparenter sind.

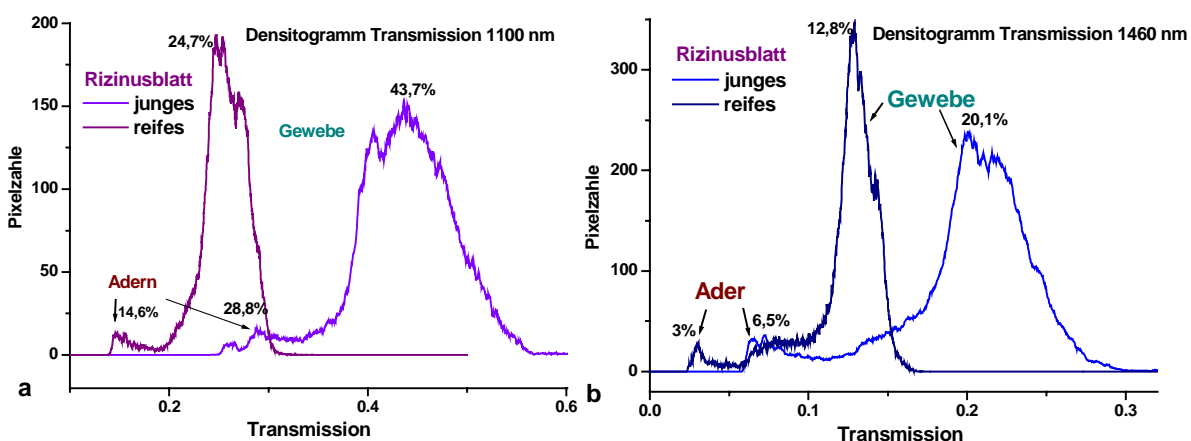


Abb.7.1.12: Vergleich der Densitogramme von Spektralbildern eines jungen und reifen Rizinus Blattes bei 1100 nm (a) und bei 1460 nm (b).

Der Vergleich der typischen Densitogramme von wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten Tabak Blätter ist in Abb.7.1.13 zu sehen. Nach der Wasserinfiltration des Blattes verschieben sich die Banden der Densitogramme, die dem Blattgewebe entsprechen, in

dem Spektralbereich der großen Transmission. Außerdem ändert sich stark die Form und die Höhe dieser Banden. Im Spektralbereich der Absorptionsbande bei 1460 nm wird das Densitogramm-Maximum nach der Wasserinfiltration breiter und seine Höhe kleiner. Für die Wellenlänge 1100 nm konvergiert die Densitogramm-Hauptbande und ihre Peak-Höhe nimmt zu. Die hohen Banden der Densitogramme entsprechen den mehr homogenen Objektstrukturen. Damit führt die Wasserinfiltration der Blätter zu entgegengesetzten Effekten in verschiedenen Spektralbereichen.

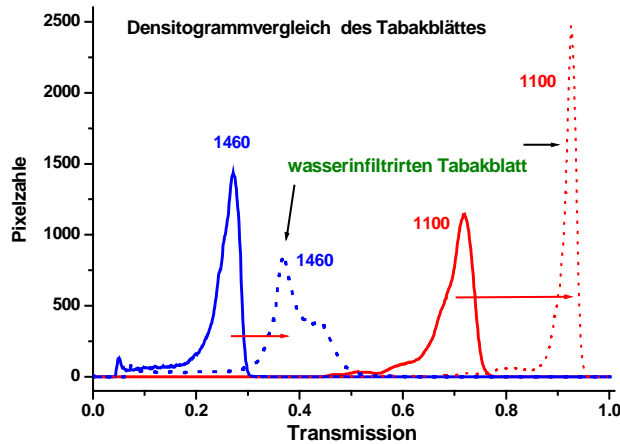


Abb.7.1.13: Vergleich der Densitogramme von Spektralbildern eines wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten Tabak Blattes bei 1100 nm und bei 1460 nm.

Eine Übersicht der Densitogramm-Familie für junge und reife Rizinus Blätter ist in Abb.7.1.14 und für die wasserinfiltrierten und nichtinfiltrierten Tabak Blätter in Abb.7.1.15 präsentiert. Die Densitogramme des jungen Blattes im Spektralbereich der Absorptions-bande $2V_{OH}$ 1300-1600 nm sind breiter. Im reifen Rizinus Blatt sind die Wasserzustände mehr ähnlich. Darauf weisen enge und hohe Densitogramm-Maxima bei 1460-1500 nm hin.

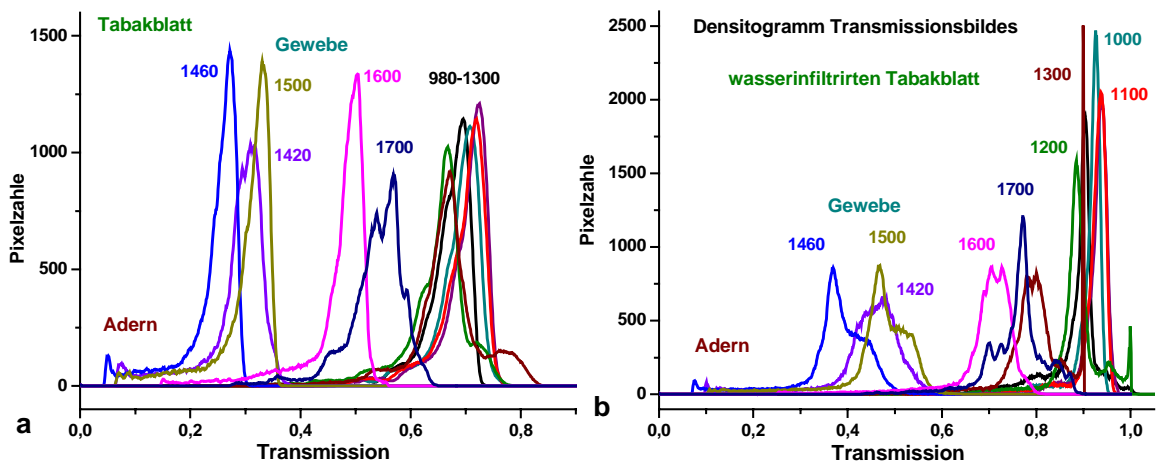


Abb.7.1.14: Familie der Densitogramme von Transmission-Spektralbildern von einem reifen (a) und jungen (b) Rizinus Blatt.

Entsprechend den hohen Maxima der Densitogramme für das Tabak Blatt bei 1460-1500 nm ist das Spektrum der Wasserzustände in diesem Blatt auch schmalbandig (Abb.7.1.15a). Die Inhomogenität des Blattgewebes im Spektralbereich des Wasserobertones bei 1460 nm äußert sich nach der Wasserinfiltration. Gleichzeitig wächst die Homogenität des Blattes im Spektralbereich 980-1300 nm. Eine Information über die räumliche Homogenität der Struktur von studierten Objekten ist eine einzigartige positive Besonderheit der bildgebenden Spektroskopie.

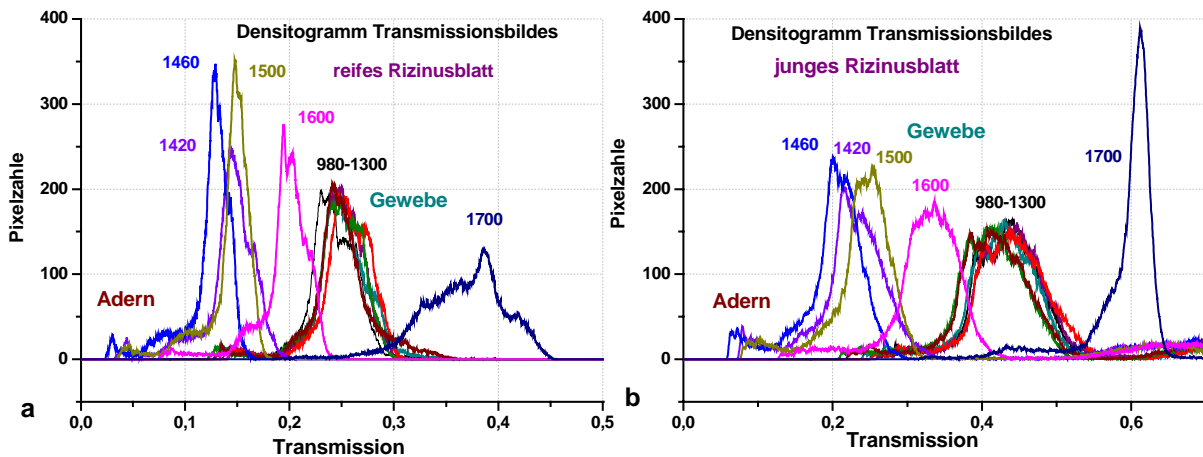


Abb.7.1.15: Familie der Densitogramme von Transmission-Spektralbildern vom nichtinfiltrierten (a) und wasserinfiltrierten Tabak Blatt(b).

Ermittlung der Spektren mittels der Densitogramme

Die entwickelte DSA-Methode ermöglicht es, zwei unterschiedlichen Arten von Spektren zu bekommen: nach den Lagen der Maximal von den Densitogramm-Banden und nach der Höhe der Maxima von Densitogrammen. Die erste Spektrenart entspricht den gewöhnlichen Frequenzspektren, die mit allen konventionellen Spektrometern gemessen werden können. Wie bekannt, charakterisieren diese Spektren die energetische Zustände der Moleküle in verschiedenen Zeitmomente. Zusätzliche räumliche Koordinaten in bildgebender Spektroskopie liefern eine früher unzugängliche Information über die Strukturordnung der studierten Objekte. Für diese Zwecke wurden zum ersten Mal die Raumspektren ermittelt. Diese Spektren charakterisieren die Struktur und die Homogenität der gewählten Klasse von Bildpixeln mit den gleichen Eigenschaften. Die Raumspektren charakterisieren auch die kollektiven Eigenschaften verschiedener Energiezuständen von Molekülen.

Aus der Lage der beiden Maxima in den Densitogrammen auf der Transmissionsachse wurden die Transmissionsspektren für das Gewebe und Hauptadern des reifen Rizinus Blattes ermittelt. Sie sind in Abb.7.1.16a gezeigt. Ähnliche Spektren für das junge Rizinus Blatt sind in Abb.7.1.16b dargestellt. In diesem Fall sind wegen den mehreren vorhandenen Maxima in den Densitogramm-Banden jeweils zwei Transmissionsspektren für das Blatt-gewebe und seiner Adern gezeigt. Die Transmissionsspektren für Gewebe und Adern sind nahezu ähnlich, aber für die Adern wird ein größeres MLS-Niveau beobachtet. Im Spektralbereich 900-1300 nm ist es für Adern ~85%, und für Blattgewebe ~75%. Im Gewebe des jungen Rizinus Blattes ist das MLS-Niveau etwa vom 60 % Wert.

Die DSA-Methode ermöglicht es, gleichzeitig mehrere Spektren zu bekommen, die nach verschiedenen Maxima spektraler Densitogramme ausgerechnet werden. Solche Spektren entsprechen verschiedenen Strukturen des Blattgewebes und seiner Adern.

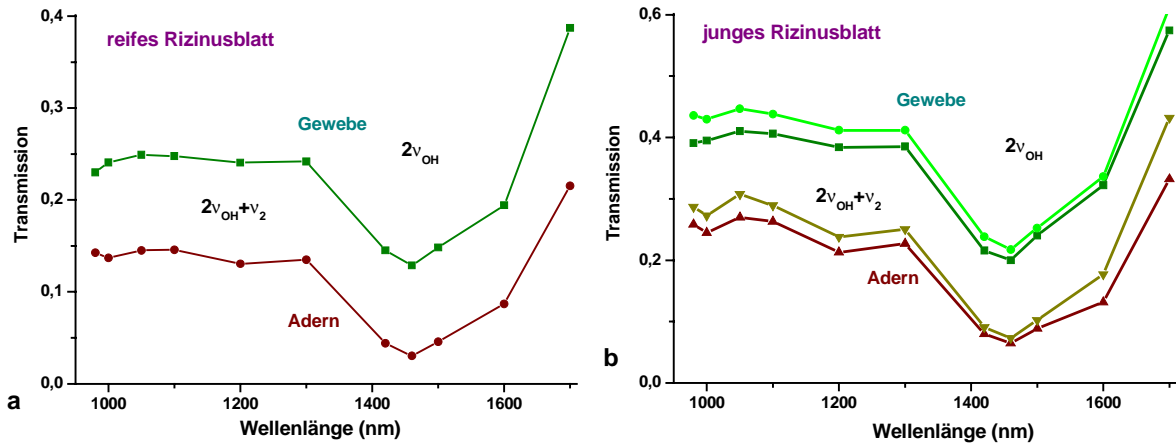


Abb.7.1.16: Transmissionsspektren für Gewebe und Adern eines reifen (a) und jungen (b) Rizinus Blattes.

Eine komplizierte Struktur der Densitogramme vom Tabak Blatt bei 1200 nm ist in Abb.7.1.17 gezeigt. Entsprechend der Densitogramm-Maxima können für das Blattgewebe zwei Komponenten Gw1 und Gw2 unterschieden werden, die den verschiedenen Bereichen des Blattgewebes entsprechen. Für die Adern wurden auf solche Weise drei Komponenten Ad1,2,3. extrahiert. Es ist bemerkenswert, daß sich diese Strukturen der Densitogramm-Banden für allen Wellenlängen erhalten und ihre eindeutige Übereinstimmung beobachtet werden. Dies ermöglicht, mehrere Spektren für Blattgewebe und Adern, das heißt für die Blattstrukturen mit den verschiedenen Spektralcharakteristiken, zu erstellen In diesem Fall es sind die Blattstrukturen; die die verschiedene Wasserzustände enthalten.

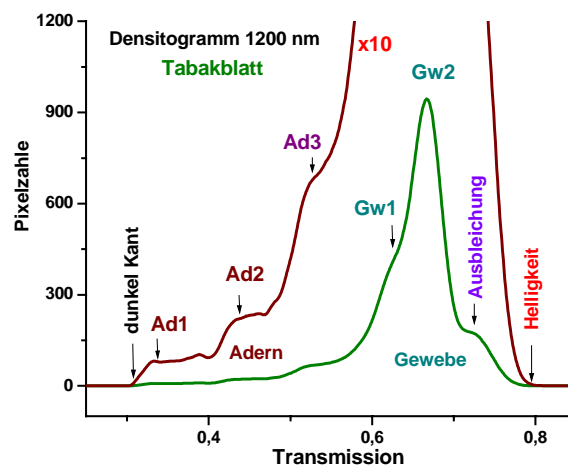


Abb.7.1.17: Struktur des Densitogramms vom Transmissionsbild eines Tabak Blattes.

Die Transmissionsspektren für nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Tabak Blätter sind in Abb.7.1.18 dargestellt. Die Spektren für die dunklen und hellen Kanten der Densitogramme sind da auch gezeigt. Die Spektren für die Densitogramm-Kanten entsprechen dem Wasser an den dunkelsten und hellsten Stellen in den Transmissionsspektren des Blattes, das heißt den höheren und niedrigeren Transmissionswerten. In den Transmissionsspektren ist die Wasserabsorptionsbande des Obertones $2\nu_{OH}$ (1460 nm) gut sichtbar. In den Spektren der dicken Adern (dunkle Kante des Densitogramms) und des Blattgewebes (Hauptmaximum des Densitogramms) sind auch die Banden des Kombinationstones $2\nu_{OH}+\nu_2$ (1200 nm) gut zu sehen. Im Spektrum, das den hellsten Blattbereichen entspricht (helle Kante des Densitogramms) wurde die Beobachtung dieser Bande wegen dem Aufhellungseffekt des Blattgewebes im Spektralbereich 1200-1300 nm erschwert. Im wasserinfiltrierten Tabak Blatt sinkt das MLS-Niveau und die Bande $2\nu_{OH}+\nu_2$ ist schlecht ausgeprägt. Anschließend wurden die Extinktionsspektren aus den Transmissionsspektren ermittelt und daraus die Wasserabsorptionsbanden extrahiert.

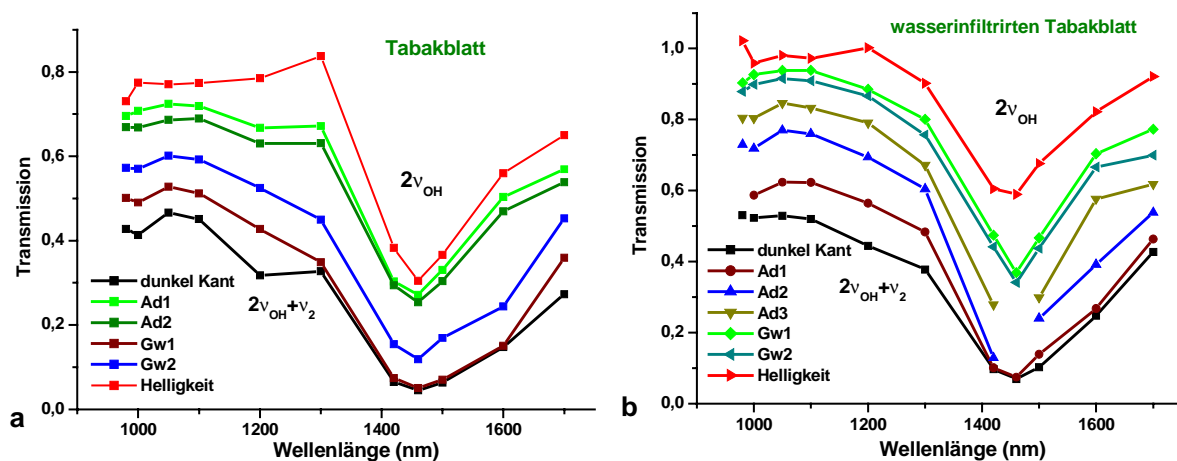


Abb.7.1.18: Transmissionsspektren von Gewebe und Adern eines nichtinfiltrierten (a) und wasserinfiltrierten (b) Tabak Blattes.

Die Durchsichtigkeit der Pflanzenblättern, die mittels des entwickelten bildgebenden CCD-Spektrometers im Spektralbereich der niedrigen Absorption für das Rizinus und Tabak Blatt gemessen wurde, ändert sich von 20 bis zu 65% (Abb 7.1.18). Die gleiche Messung mittels des konventionellen IR-Spektrometers ergab für die entsprechende Durchsichtigkeit der Blätter weniger als 1%, was auf einen bedeutenden Anteil der nicht registrierten gestreuten Strahlung zuführen ist. Die Transmission der Blätter, die mit Hilfe des entwickelten bildgebenden Spektrometers registriert wurde, steigt ungefähr um das 50fache. Es spricht dafür, daß dieses Modell des bildgebenden CCD-Spektrometers über eine größere Sensibilität gegenüber den kommerziellen Spektrometern verfügt. Dies ist durch eine Sammlungsfunktion der ähnlichen Signale über eine große Pixelanzahl (1024x1280) und eine bessere Registrierung der gestreuten Strahlung bedingt.

MLS-Spektren im Bereich der Wasserabsorptionsbanden

Die Methode, die das Eintauchen der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund berücksichtigt, ermöglicht es auch, die Form der Spektren der Lichtstreuung im Bereich der Wasserabsorption zu ermitteln. Die berechneten MLS-Spektren für das Gewebe und für die Adern des reifen Rizinus Blattes sind in Abb.7.1.19a gezeigt. Das Minimum im

MLS-Spektrum entspricht den Maximum der Absorptionsbande. Die Mehrfachlichtstreuung in Adern ist an den Flanken der Wasserbande bei 1460 nm stärker als es im Blattgewebe. Dabei im Maximum dieser Bande ist die MLS im Blattgewebe zweimal größer als in den Adern (33% und 17% entsprechend). Für nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Tabak Blätter sind die MLS-Spektren in Abb.7.1.19b gezeigt. Hier ist der Unterschied im MLS-Niveau in den Adern und im Blattgewebe außerhalb der Bande 1460 nm größer als im Rizinus Blatt. Im Zentrum der Bande $2\nu_{OH}$ für das Blattgewebe ist die MLS stärker gegenüber den Adern. Bei der Wasserinfiltration ändert sich das MLS-Niveau in den Adern nicht so stark wie im Blattgewebe, wo sich der MLS-Beitrag um 2-3faches verringert. Die Resonanzspektren der MLS sind auch in Abb.7.2.4 gezeigt. Daher erkennt man, daß der MLS-Beitrag im Bereich der Hauptadern fast bis auf Null reduziert und kann unberücksichtigt bleiben.

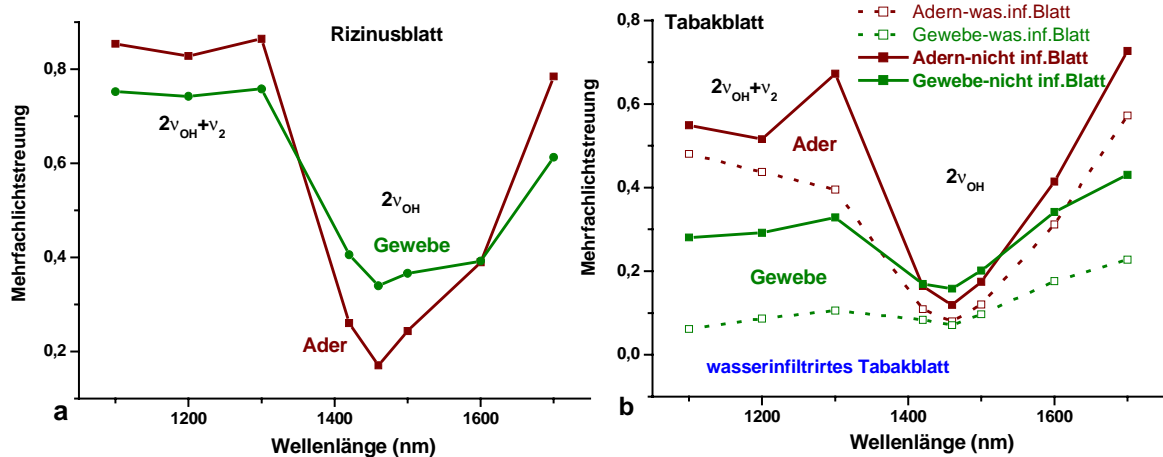


Abb.7.1.19: MLS-Banden im Bereich der $2\nu_{OH}$ Wasserbande für Gewebe und Adern von Rizinus Blatt (a) sowie von nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Tabak Blatt (b).

7.2. Bestimmung des Wassergehaltes in Pflanzenblättern

Anwendungen digitaler Bildaufnahmetechniken, die die optische Wechselwirkungsprozesse im pflanzlichen Gewebe nutzen, werden bei der Untersuchung vieler biologischer Fragen eingesetzt. In vorliegender Arbeit wurde das Verfahren der bildgebenden Spektroskopie benutzt, um Wassergehalt und -zustände im Pflanzenblatt zu bestimmen. Dafür wurden die spektroskopische Methoden eingesetzt, welche die Vibrationsenergien von H₂O Molekülen in Betracht ziehen.

Für die quantitative Bestimmung des Wassergehaltes in Pflanzenblättern müssen die Absorptionsbanden von Wasser aus den MLS-Untergrund in den Extinktionsspektren extrahiert werden. Dieses Problem existiert auch in der traditionellen Spektroskopie und ist für die bildgebende Spektroskopie ebenfalls sehr wichtig. Für die Extraktion der Wasserabsorptionsbanden aus den Extinktionsspektren der Blätter wurde eine in Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode des "Eintauchens" der Banden in den Untergrund der Lichtstreuung verwendet. Dabei kann diese Methode sowohl für Transmissionsspektren verschiedener Strukturelemente (Gewebe, Adern) von Blättern (Kapitel 7.1) als auch für eine Sequenz der Spektralbilder eingesetzt werden. Dafür wurden die Spektralbilder der Transmission zuerst in die Extinktionsbilder umgewandelt, um anschließend die Absorptionsbilder zu ermitteln. Die Reihenfolge der digital-spektralen Operationen in jedem konkreten Fall ist durch die gestellte Aufgabe bedingt. Bei der Erstellung der Wasser-spektren für Blattgewebe oder für Adern kann mittels der DSA von der Analyse einer Bildsequenz zu der Analyse ihrer Spektren übergegangen werden, wie es in dem vorhergehenden Kapitel 7.1 beschrieben wurde.

Um ausführliche Profilbilder der Wasserverteilung eines Blattes zu erstellen, müssen die Sequenzen der Absorptionsbilder ausgewertet werden. Für die Bearbeitung der Sequenzen der Spektralbilder wurden die speziell geschriebenen Algorithme der Software "Heurisko" (Anhang 1 und 2) verwendet. Dies erlaubt die räumliche Verteilung der Wasserabsorptionswerte in Spektralbildern zu ermitteln. Außerdem können die speziellen Bilder bearbeitet werden, wie z.B. die Bilder der Absorptionsverhältnisse für verschiedenen Schwingungsmoden, um eine zusätzliche spektrale Information zu erhalten. So wurden die Verhältnisse der Absorptionsbilder für die Analyse der Wasserzustände in Pflanzenblättern bearbeitet. In diesem Kapitel werden die Extinktion-Densitogramme analysiert und ein Vergleich der Absorptionsspektren durchgeführt, die auf verschiedene Weise erhalten wurden.

7.2.1. Extraktion der Wasserbanden aus Extinktionsspektren

Traditionell werden die Absorptionsbanden aus dem Extinktionsspektrum mittels einer Subtraktion des nichtselektiven MLS-Untergrundes und der nichtselektiven Absorption erhalten. Die Anwendung dieser Methode ist im Bereich der sehr schwachen Absorptionsbanden berechtigt. Aber ihre Anwendung im Bereich der Schwingungsmoden von Wasser in den Pflanzenblättern führt zu falschen Ergebnissen, was in Abb.7.2.1 gezeigt ist. Die Absorptionsbanden von Gewebe der Rizinus und Tabak Blätter sind viel stärker als für die Hauptadern, obwohl die dicken Adern mehr Wasser im Vergleich zum Gewebe besitzen. Um diesen prinzipiellen Widerspruch zu überwinden, wurde eine neue Methode entwickelt, die eine Senkung des MLS-Beitrages zu der Extinktion im Bereich der Absorptionsbanden in Betracht zieht. Diese Methode berücksichtigt die Interaktion der MLS und Absorption, was zum Eintauchen der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund führt. Es ermöglicht, die Istwerte der Absorptionsbanden zu ermitteln. Die realen Absorptionsbanden können die beobachteten Absorptionsbanden infolge des Effektes des Eintauchens in den MLS-Untergrund vielfach übersteigen. Extraktion der Wasserabsorptionsbanden aus dem MLS-Untergrund des Extinktionsspektrums eines Rizinus Blattes ist in Abb.7.2.2 gezeigt.

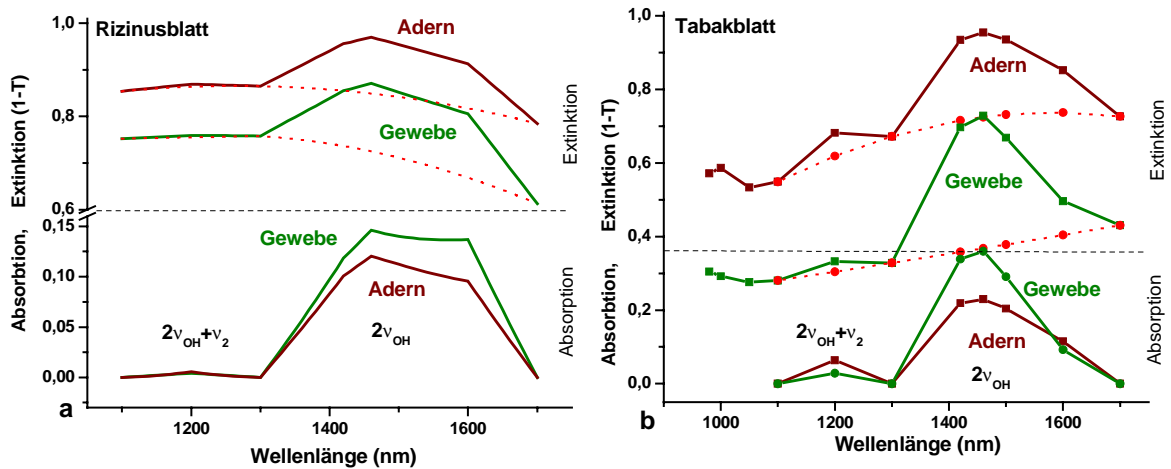


Abb. 7.2.1: Extraktion der Wasserabsorptionsbanden aus den Extinktionsspektren von Gewebe und Adern eines Rizinus (a) und Tabak Blattes (b) bei der nichtselektiven MLS.

Unter Berücksichtigung der Frequenzabhängigkeit des MLS-Niveaus und des Eintauchens der Absorptionsbanden in den Untergrund der Lichtstreuung sollen die Absorptionsbanden als Differenz der Extinktionsspektren und den berechneten MLS-Spektren ermittelt werden. Die MLS-Spektren wurden unter der Annahme berechnet, daß die Indikatoren der Lichtstreuung in den Bereichen des Absorptionsmaximums und -minimums eine ähnliche Form haben. Wie in Kapitel 6.2 gezeigt wurde, trifft diese Annahme sogar bei die stärkere Absorptionsbande von Chlorophyll bei 680 nm mit einer Genauigkeit von ca.10% zu. Die entwickelte Methode für die Auswertung der MLS-Spektren im Spektralbereich der starken Absorption hat eine allgemeine Bedeutung und kann zur Spektralanalyse inhomogener und stark streuender Objekte angewendet werden.

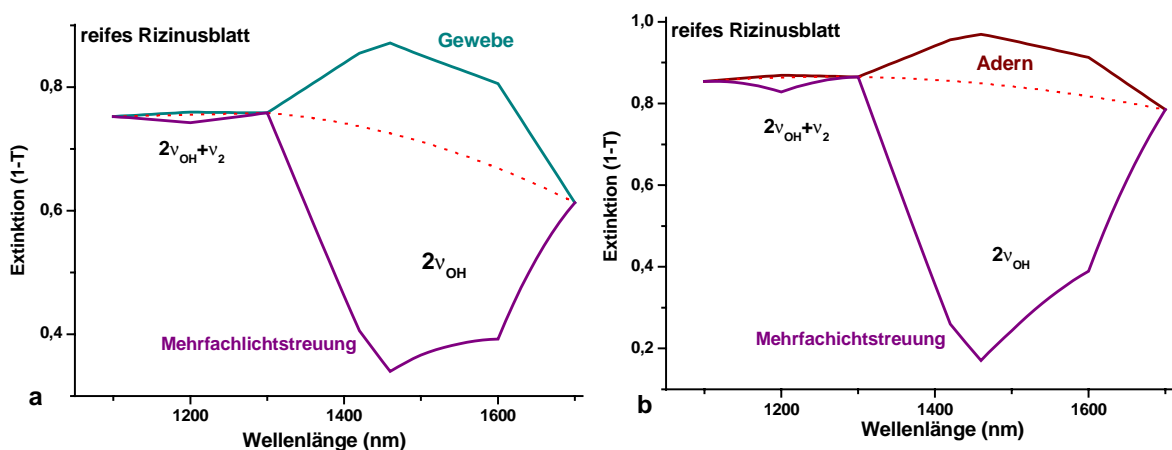


Abb. 7.2.2: Extraktion der Wasserabsorptionsbanden aus den Extinktionsspektren von Gewebe (a) und Adern (b) eines reifen Rizinus Blattes.

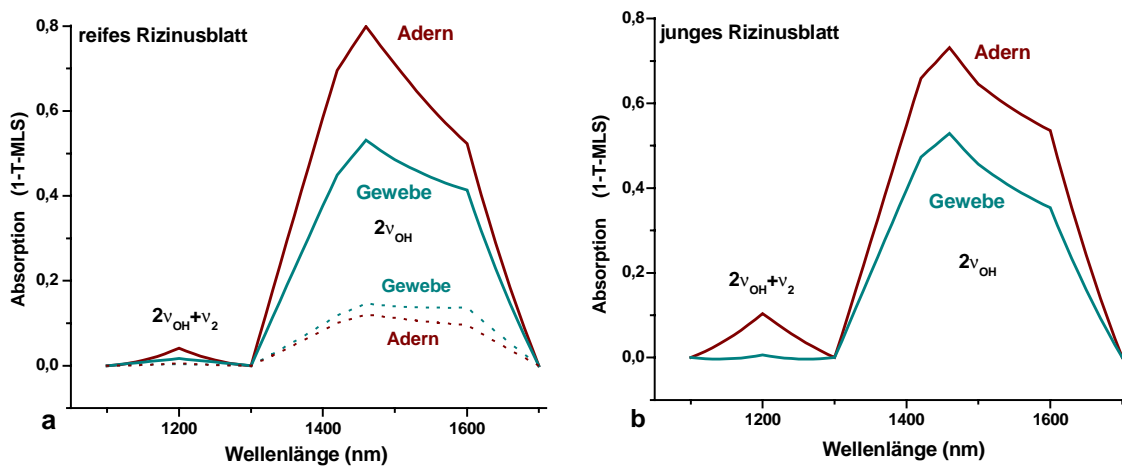


Abb. 7.2.3: Die extrahierte Wasserabsorptionsbanden eines reifen (a) und jungen (b) Rizinus Blattes.

Resultate der Extraktion von Wasserabsorptionsbanden $2v_{OH}$ und $2v_{OH}+v_2$ aus den Extinktionsspektren der Rizinus und Tabak Blätter sind in Abb.7.2.3 und 7.2.4 dargestellt. Die mittels der DSA-Methode ermittelten Transmissionsspektren für das Blattgewebe und für die Adern ermöglichen, die Methode der Extraktion der Absorptionsbanden getrennt für das Gewebe und die Adern zu verwenden. Das Niveau der nichtselektiven MLS für Adern ist größer als für Blattgewebe.

Zum Beispiel für Tabak Blatt beträgt das MLS-Niveau von Adern im Bereich der $2v_{OH}$ Absorptionsbande ca. 70% und das von Blattgewebe $\sim 35\%$ (Abb.7.2.2). Aber beobachtende Erhöhung des Extinktionsspektrums über diesem MLS-Niveau ist für Gewebe größer, was wiederum zu den falschen Ergebnissen führt (Abb.7.2.1). Deshalb wurde es berücksichtigt, daß die Absorptionsbanden in einen stärkeren MLS-Untergrund tiefer eintauchen. Die Istwerte der Absorptionsbanden wurden als Differenz der Extinktions- und MLS-Spektren berechnet. Die Ergebnisse für die reifen und jungen Rizinus Blätter sind in Abb.7.2.3 dargestellt. Wie aus dieser Abbildungen ersichtlich ist, sind die erhaltenen Wasser-absorptionsbanden für Adern höher als für Blattgewebe, was der Wirklichkeit entspricht. Zum Vergleich sind die Absorptionsbanden, die ohne Berücksichtigung des Eintauchens in MLS-Untergrund ermittelt wurden, in Abb.7.2.3a ebenfalls angegeben. Letztere sind mit den punktierten Kurven gezeichnet.

Abb.7.2.4c,d zeigt die Extraktion der Wasserabsorptionsbanden eines wasserinfiltrierten Tabak Blattes. In diesem Fall für das Blattgewebe ist der MLS-Beitrag zur Extinktion $\sim 7-8\%$ gleich und die Absorptionsbanden sind weniger in den Untergrund eingetaucht. Die direkt berechneten Spektren des Blattgewebes sind in diesem Fall den realen sehr ähnlich. Der MLS-Beitrag der Adern in wasserinfiltriertem Blatt, beträgt mehr als 50% und die Absorptionsbande ist in den MLS-Untergrund stark eingetaucht (Abb.7.2.4c). Deswegen ist die Istwerte der Absorptionsbande bei 1460 nm doppelt so groß wie die der beobachtenden Bande. Auffällig aus diesen Spektren ist die starke Überhöhung der Istwerte der Wasser-absorption gegenüber der beobachteten Absorptionsbanden. Die Maximumvergrößerung der wahren Banden im Vergleich zu den beobachteten beträgt für das reife Rizinus Blatt 3,6 für das Blattgewebe und 6,6 für die Adern. Für ein Tabak Blatt sind die entsprechenden Werte 1,6 und 3,6 gleich.

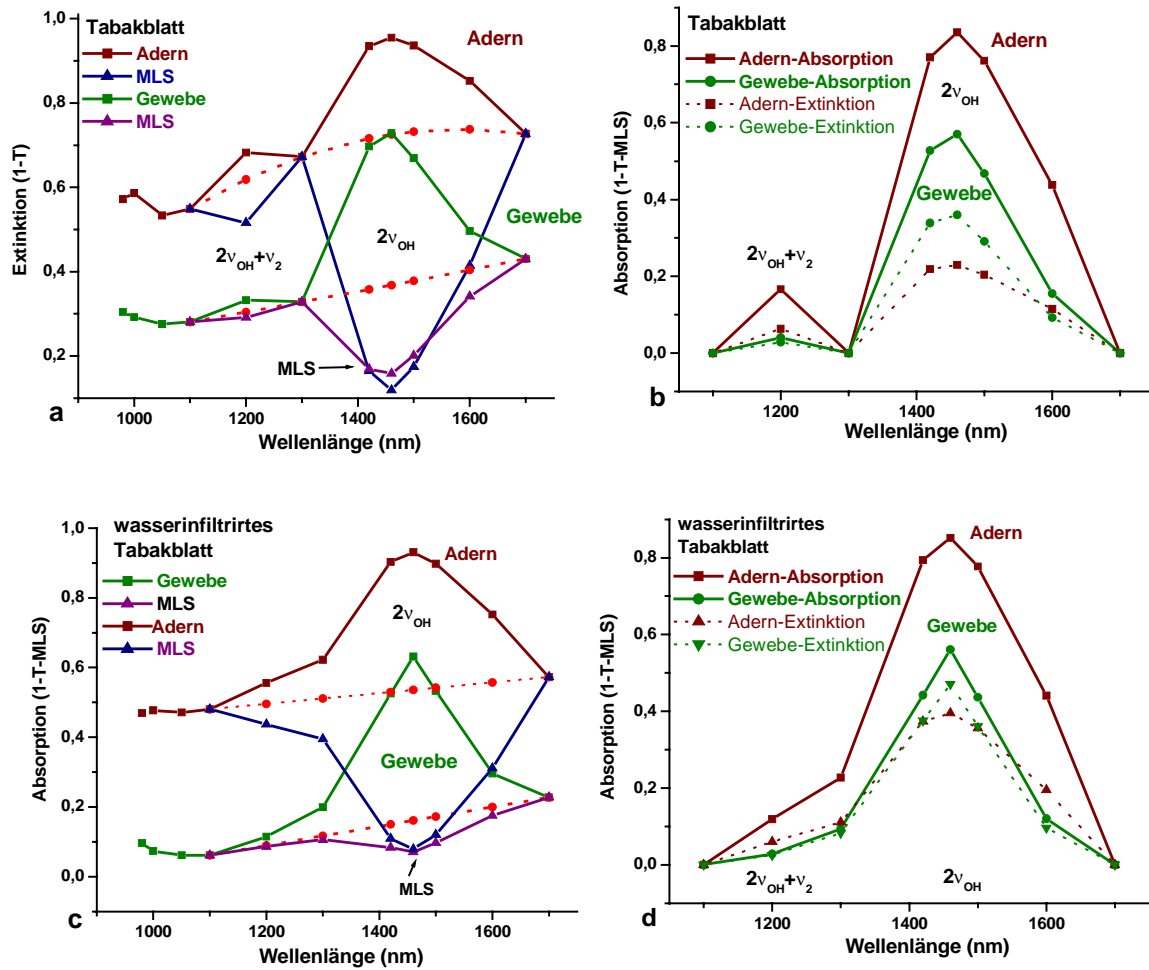


Abb. 7.2.4: Extraktion der Wasserabsorptionsbanden für Gewebe und Adern (a, c) und die normierten Absorptionsbanden eines nichtinfiltrierten (b) und wasserinfiltrierten (d) Tabak Blattes.

7.2.2. Spektralbilder der normierten Blattwasserabsorption

In der IR Spektroskopie werden üblich die optische Dichte oder spezifische Koeffizienten der Absorption $\alpha(\lambda)$ gemessen. In der Spektroskopie der Pflanzenblätter könnten die Spektraldaten als Teile des transmittierten $T=I/I_0$, gestreuten $B=I(\text{MLS})/I_0$ und absorbierten $A=1-T-B$ Lichtes sehr anschaulich dargestellt werden (B ist eine Basislinie der MLS-Niveaus). Bei solcher Darstellung sind die Beiträge dieser Komponenten zu den integralen Lichtprozessen im Blattgewebe gut übersichtlich. Dabei ist es bequemer die Banden der *normierten* Absorption aus dem Extinktionsspektrum $E(\lambda)=1-T(\lambda)$ zu extrahieren. Für die Ermittlung der Profilbilder der effektive Wasserdicke in den Blattgeweben und Adern, muß man die Profile der optischen Dichte (Extinktion) des Blattes im Bereich der Wasserabsorptionsbanden auswerten.

In Abb. 7.2.5 sind die Bilder der normierten Absorption im Bereich des Bandenmaximums bei 1460 nm eines reifen und jungen Rizinus Blättes präsentiert. In diesen Spektralbildern entsprechen größere Wasserabsorptionswerte den größeren Grauwerten. Deshalb sehen die Blattadern in Absorptionsbildern im Unterschied zu den Transmissionsbildern (Abb. 7.1.9 und 7.1.12) hell aus. Dabei sieht das Blattgewebe dunkel aus, was einem geringeren Wassergehalt entspricht. Diese Absorptionsbilder wurden mittels des speziellen Heurisko-Workspaces "Absorption" ausgerechnet (Anhang 1). Für jedes Pixel

der Spektralbilder wurden die gleichen Operationen durchgeführt, die in dem vorhergehenden Kapitel 7.1. für die Transmissionspektren beschrieben sind. Dafür wurden die Absorptionswerte

$$A_{xy}=1-T_{xy}-MLS_{xy}$$

ausgerechnet. Dabei wurde die lineare Annäherung des Basisniveaus B für die Bande $2\nu_{OH}+\nu_2$ (1200 nm) mit Hilfe der zwei Extinktionsbilder $E(\lambda)$ bei 1100 und 1300 nm im Absorptionsminima des Wassers berechnet. Für die Absorptionsbilder bei 1460 nm wurde die lineare Annäherung des MLS-Basisniveaus als Mittelwert der Extinktionsbilder bei 1300 und 1700 nm ermittelt.

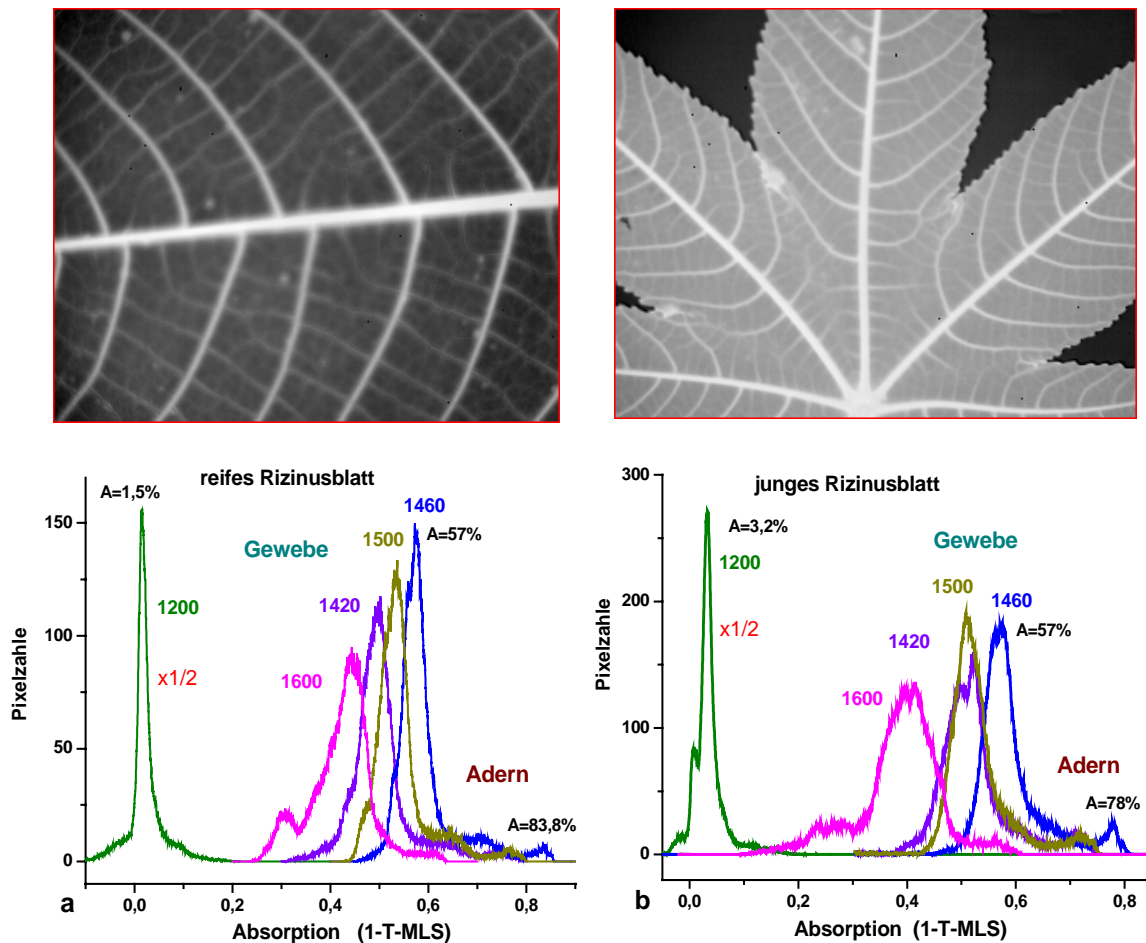


Abb. 7.2.5: Absorptionsbilder bei 1460 nm und die spektralen Densitogramm-Familien eines reifen (a) und jungen (b) Ricinus Blattes.

Für die ermittelten Sequenzen der Spektralbilder $A(\lambda_N)$ wurden die entsprechende Spektral-Densitogramme ausgewertet. Die spektralen Densitogramm-Familien der Absorptionsbilder für die reifen und jungen Ricinus Blätter sind in Abb.7.2.5 gezeigt. Die Hauptmaxima dieser Densitogramme entsprechen dem Blattgewebe. Die schwache Densitogramm-Maxima im Bereich der Absorptionswerte $A=0,7-0,8$ entsprechen den kleinen Blattadern und den Seitenadern. In den Densitogrammen des reifen Ricinus Blattes sind die Maxima der Seitenadern deutlich ausgeprägt. Für das junge Blatt überlappen die Densitogramm-Banden, die den Seitenadern entsprechen, mit den Banden des Blattgewebes. Im Spektralbereich des Maximums der Wasserabsorptionsbande bei 1460 nm im Blattgewebe wird 60% des einfallenden Lichtes absorbiert. Im Bereich der schwächeren Bande bei 1200 nm wird nur 1,5-3,2% des Lichtes absorbiert.

Die Blattadern absorbieren in Bereich bei 1460 nm ca. 80% und bei 1200 nm nur 2-5% der einfallenden Strahlung.

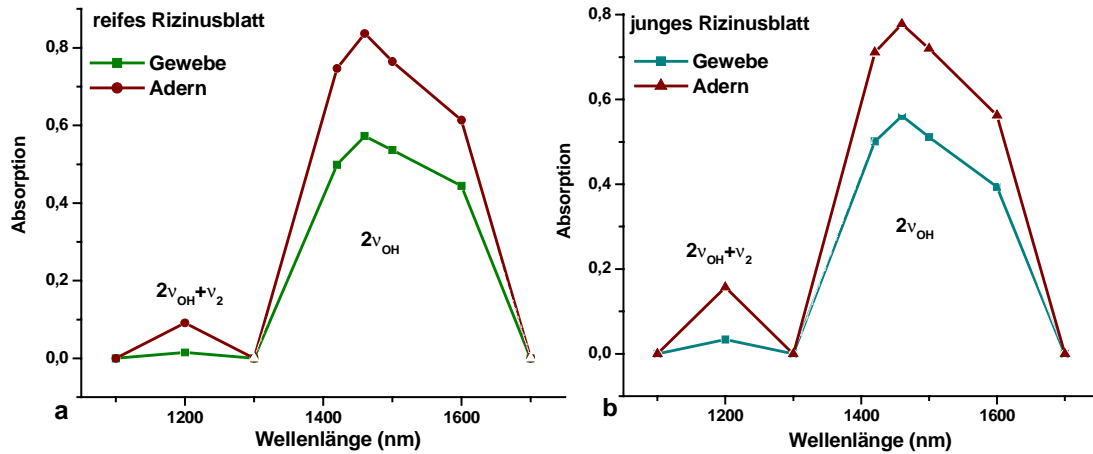


Abb.7.2.6: Die nach den Lagen der Densitogramm-Maxima ermittelte Wasserabsorptionsbanden eines reifen (a) und jungen (b) Rizinus Blattes.

Nach der Lage der Densitogramm-Maxima wurden die Spektren der normierten Absorption $A(\lambda_N)$ für Haupt- und Seitenadern sowie für das Blattgewebe ermittelt. Diese Spektren für die reifen und jungen Rizinus Blätter sind in Abb.7.2.6 gezeigt. Die erhaltenen Absorptions-spektren stimmen mit den früher berechneten Wasserspektren (aus den Transmissions-bildern) überein (Abb.7.2.3).

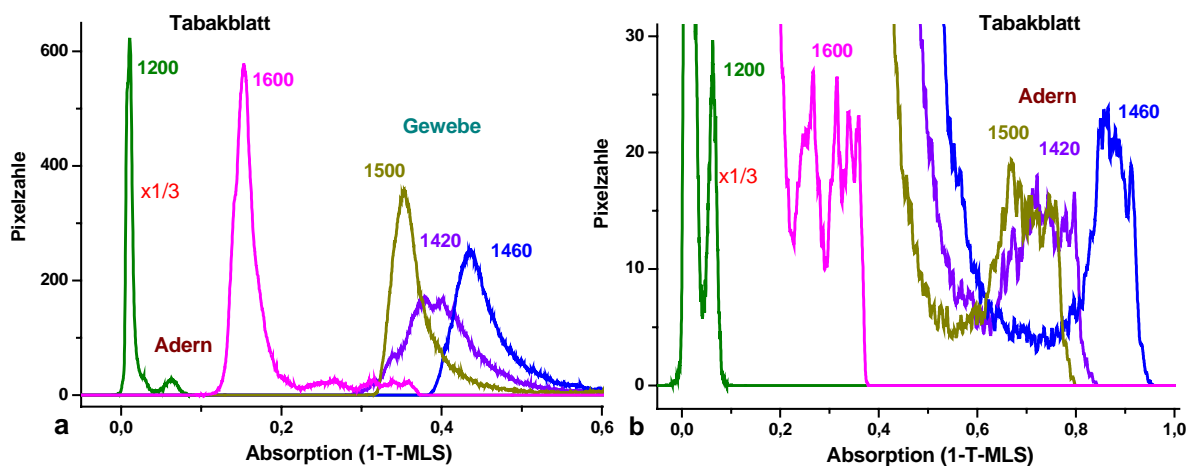


Abb.7.2.7: Densitogramm-Familie der Absorptionen für Gewebe(a) und Adern (b) eines Tabak Blattes.

Für die Tabak Blätter wird die spektrale Densitogramm-Familie der normierten Absorption $A=1-T-MLS$ in Abb.7.2.7 präsentiert. Die Densitogramm-Maxima für alle gemessenen Wellenlängen von Gewebe und Adern des Tabak Blattes sind getrennt gezeigt. Nach der Lage der Hauptmaxima (entsprechen dem Blattgewebe) und der zwei Maxima (entsprechen den Adern) wurden die entsprechenden Absorptionsspektren $A(\lambda_N)$ ermittelt (Abb.7.2.8). Das Gewebe des betrachtenden Tabak Blattes absorbiert im Spektralbereich des Obertones $2v_{OH}$ ca. 44% des Lichtes (in Rizinus 57%) In Tabakadern wurde bis zu 90% der Strahlung bei 1460 nm und bis zu 5% der Strahlung bei 1200 nm absorbiert. Zusammen mit den Transmissionspektren (Abb.7.1.17 und

7.1.19) geben die analysierten Spektren der normierten Absorption $A(\lambda_N)$ eine komplettere Beschreibung der optischen Prozesse in den Blättern. Die charakteristischen Werte der normierten Transmission, Absorption und der MLS für die reifen Tabak und Rizinus Blätter im Spektralbereich der Wasserabsorptions-banden bei 1200 und 1460 nm sind in der Tabelle 7.2.1 zusammengefaßt.

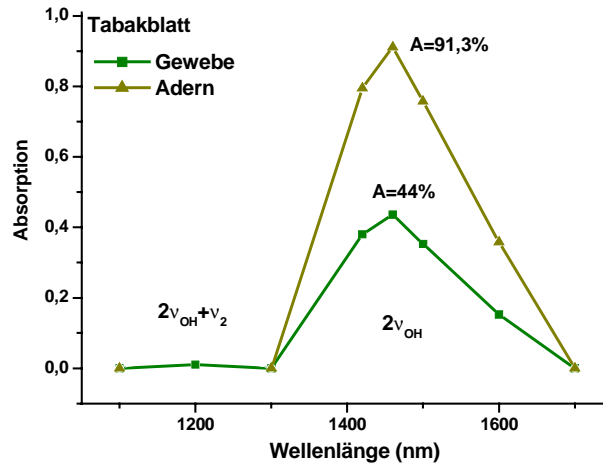


Abb.7.2.8: Wasserabsorptionsbanden für Gewebe und Adern eines Tabak Blattes.

Pflanzenblatt		Wasserband $2\nu_{OH}+\nu_2$ ($\lambda=1200$ nm)			Wasserband $2\nu_{OH}$ ($\lambda=1460$ nm)		
		T, %	A, %	MLS, %	T, %	A, %	MLS, %
Tabak	Gewebe	70	5	25	25	45	30
	Adern	35-40	10-15	50	5	83	12
Rizinus	Gewebe	24	2-3	74	13	53	34
	Adern	13	4-5	83	3	80	17

Tabelle 7.2.1: Die Werte der normierten Transmission (T), Absorption(A) und MLS für Tabak und Rizinus Blätter im Spektralbereich der Wasserbanden $2\nu_{OH}+\nu_2$ und $2\nu_{OH}$

7.2.3. Spektrale Bestimmung der effektiven Wasserdicke

Für die quantitative Bestimmung der räumlichen Verteilung des Wassergehaltes in Pflanzenblättern wurden die ermittelten Spektralbilder der optischen Dichte (Extinktion) $D(x,y,\lambda_N)=\log(I_0/I)$ und der Absorption $A(x,y,\lambda_N)$ verwendet. Die Spektralbilder $D(x,y)$ des Tabak Blattes für die Maxima der Banden $2\nu_{OH}$ und $2\nu_{OH}+\nu_2$ sind in Abb.7.2.9 dargestellt. Dort sind auch die aus der $D(x,y,\lambda_N)$ -Sequenz ermittelten Absorptionsbilder $A(x,y)$ gezeigt. Neben den Bilder sind die Bereiche der registrierten Extinktions- und Absorptionswerte angegeben.

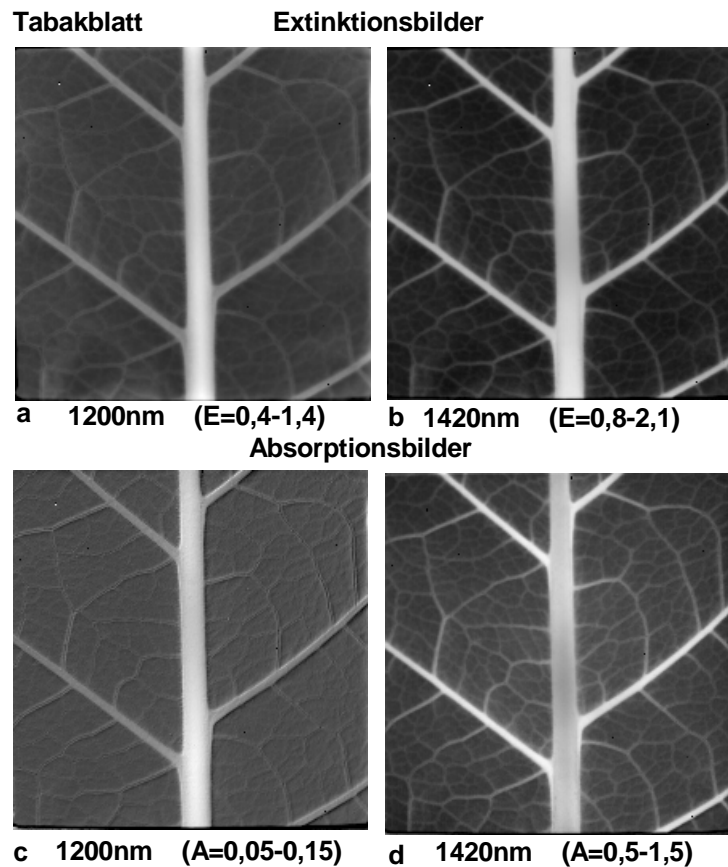


Abb. 7.2.9: Spektralbilder der Extinktion (a, b) und Absorption (c, d) eines Tabak Feldblattes.

Auf diesen Bildern sehen die Blattadern wegen der stärkeren Wasserabsorption hell aus. In Abb.7.2.10 sind die Extinktions- und Absorptionsbilder für das Rizinus Blatt zu sehen. Die Absorptionsbilder wurden für die Bestimmung der quantitativen Profilbilder des Wassergehaltes in den Blättern verwendet. Um die Zuverlässigkeit der entwickelten Methode für die Bestimmung der effektiven Wasserdicken in den Pflanzenblättern zu gewährleisten, wurden Kontrollküvetten mit destilliertem Wasser einer Dicke von 1 mm verwendet. Auffällig in der Abb.7.2.10 ist die gesetzmäßig stärkere Wasserabsorption in der Küvette im Bereich der Bande bei 1460 nm als im Bereich bei 1200 bzw. 1600 nm.

Die Familie der Extinktionsdensitogramme für das Tabak Blatt wird in Abb.7.2.11 präsentiert. Die Densitogrammbanden für das Blattgewebe und die Adern werden gesondert gezeigt. Nach der Lage der Maxima der Densitogrammbanden wurden die Extinktionsspektren des Wassers im Blattgewebe und in der Adern ermittelt (Abb.7.2.12). Sie enthalten den bedeutenden MLS-Beitrag. Die Extraktion der Wasserabsorptionsbanden für das Gewebe und für die Adern des Tabak Blattes unter Berücksichtigung des Eintauchens der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund ist in Abb.7.2.13 dargestellt.

Für eine Bestimmung der effektiven Wasserdicken d_{eff} in Pflanzenblättern wurde folgende Methode entwickelt. Wie es schon gezeigt wurde, sind die Absorptionsbanden $2\nu_{\text{OH}}$ und $\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ von Pflanzenblättern in ihrem Verhalten zu diesen von destilliertem Wasser ähnlich (Kapitel 7.1.1). Deshalb wurden für die Bestimmung der effektiven Wasserdicke d_{eff} die Daten der Absorption von destilliertem Wasser im Bereich der $2\nu_{\text{OH}}$ Bande (1460 nm)

verwendet. In Abb.7.2.14 sind die extrahierte Wasserabsorptionsspektren für das Gewebe und die Adern eines Tabak Blattes zusammengefasst.

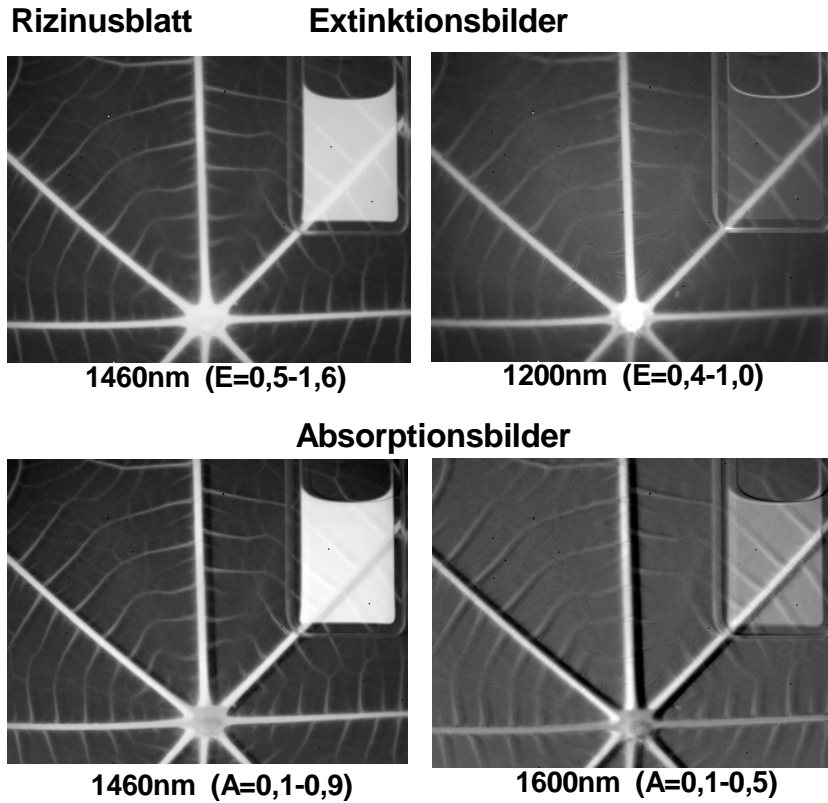


Abb.7.2.10: Spektralbilder der Extinktion (a, b) und der Absorption (c, d) eines Rizinus Blattes bei den verschiedenen Wellenlängen. Eine 1 mm dicke Küvette mit destilliertem Wasser wurde für die Kontrolle eingesetzt.

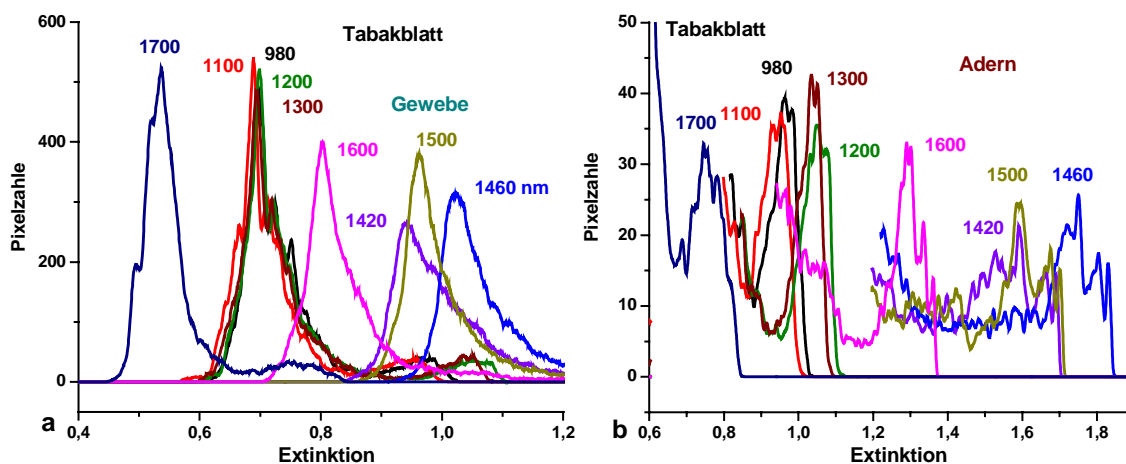


Abb.7.2.11: Densitogramme der Extinktion für Gewebe(a) und Adern (b) eines Tabak Blattes.

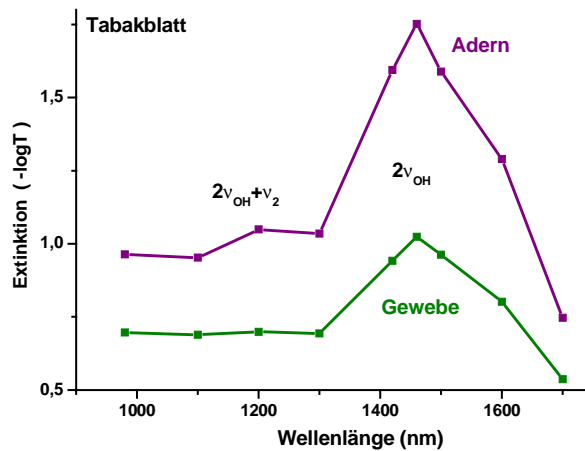


Abb.7.2.12: Extinktionsspektren für Gewebe(a) und Adern (b) eines Tabak Blattes.

In Abb.7.2.14 wird das Spektrum der Absorption von destilliertem Wasser in der 1 mm dicke Küvette (blaue Kurve) ebenfalls gezeigt. Die Werte der effektiven Wasserdicken d_{eff} wurden aus dem Verhältnis der Absorptionsbanden des Tabak Blattes zu diesen des destillierten Wasser ermittelt. Die Wasserbanden $2v_{OH}$ in den Blättern haben eine größere Halbwertsbreite im Vergleich zu dem destillierten Wasser, was für die Kontrollmessungen benutzt wurde. Dies ist durch den MLS-Einfluß bedingt. Deshalb wurden die Werte der effektiven Wasserdicken d_{eff} im Bereich des Maximums der Absorptionsbande 1460 nm berechnet, wo der MLS-Einfluß am schwächsten ist. Für das Gewebe eines dicken Tabak Feldblattes betragen die gefundenen Werte $d_{eff}=0,66$ mm, und in Adern $d_{eff} = 1,31$ mm. Der Wert d_{eff} für das Blattgewebe ist aufgrund einer Verstärkung der Wasserbanden wegen des MLS-Einflusses etwas erhöht. Deswegen sollen die d_{eff} Werte um den Verstärkungskoeffizienten korrigiert werden.

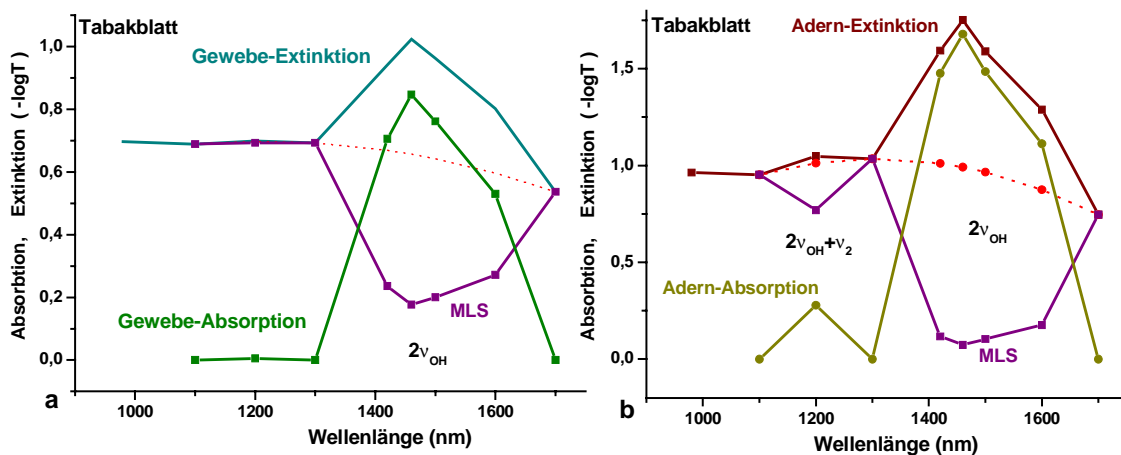


Abb.7.2.13: Extraktion der Wasserabsorptionsbanden aus den Extinktionsspektren für das Gewebe (a) und für die Adern (b) eines Tabak Blattes.

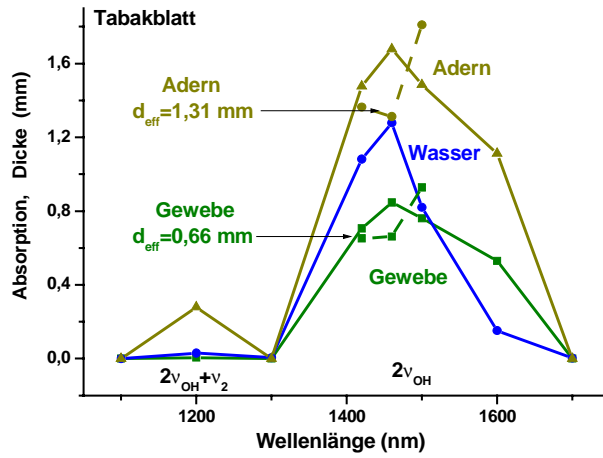


Abb. 7.2.14: Ermittlung der effektive Dicke (d_{eff}) von Wasser im Tabak Blatt. Absorptionsbanden der Adern und des Gewebes eines Tabak Blattes und der 1 mm dicke Wasserschichte

7.2.4. Verstärkung der Absorptionsbanden infolge der MLS

Die Wasserabsorptionsbanden im Blatt werden infolge einer Vergrößerung der effektiven Weglänge des Lichtes im Medium verstärkt. Eine folgende Vorstellung über die MLS-Prozesse in den Pflanzenblättern könnte die Extraktion des MLS-Spektrums erklären. Die Form des MLS-Spektrums kann durch eine Subtraktion der Extinktionsspektren des Blattes vor und nach der Wasserinfiltration ermittelt werden (Abb.7.2.15). Das Maximum einer sehr breiten MLS-Bande liegt im Bereich 2200 nm. Dieser Wert kann die Größe der effektiven lichtstreuenden Inhomogenität ($\sim 2 \mu\text{m}$) charakterisieren. Auf dem Untergrund des breiten MLS-Spektrums sind die Absorptionsbanden von Wasser und Chlorophyll erkennbar. Aus den sichtbaren Veränderungen der Absorptionsbanden kann man eine Schlußfolgerung über den größeren Verstärkungskoeffizienten der Absorptionsbanden im kurzwelligeren Bereich ziehen.

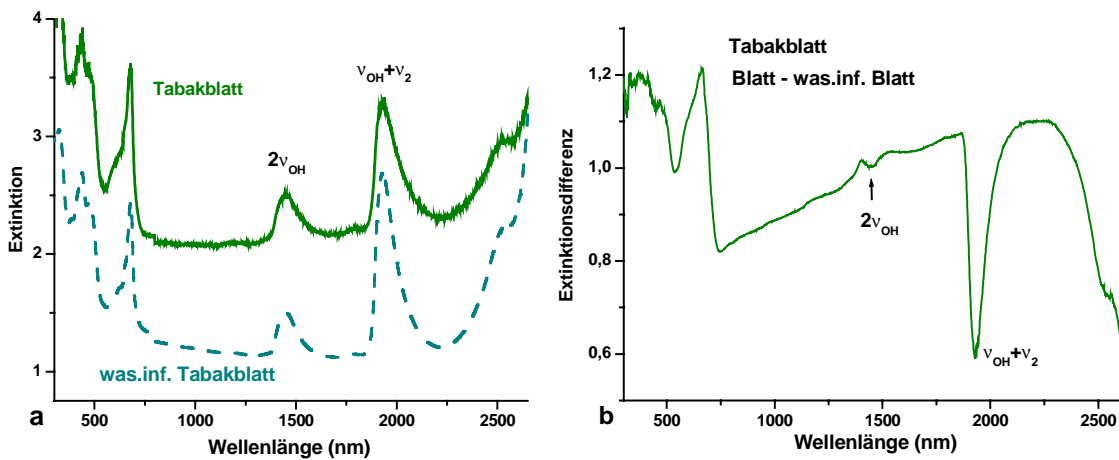


Abb. 7.2.15: Extinktionsspektren von nichtinfiltriertem und wasserinfiltriertem Tabak Blatt (a). Differenzspektrum (b) stellt das MLS-Spektrum dieses Blattes dar.

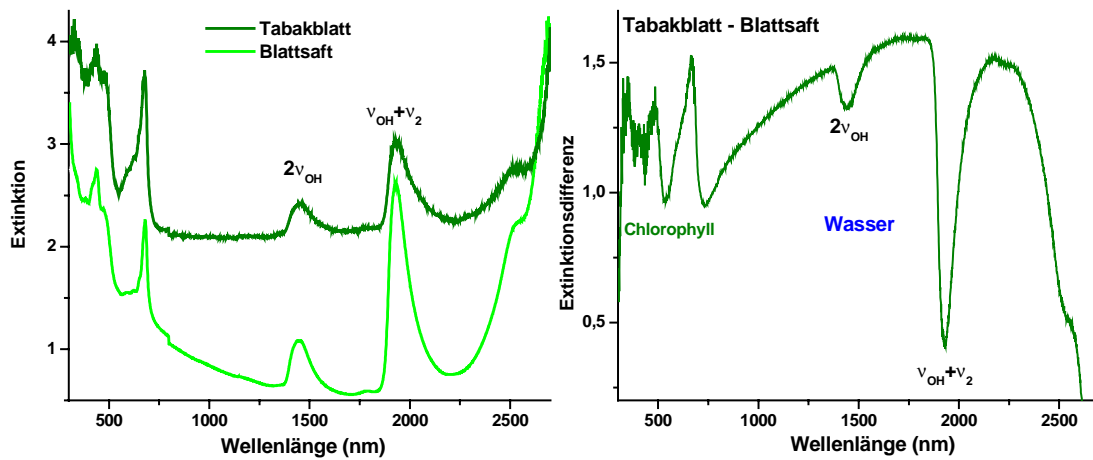


Abb.7.2.16: Extinktionsspektren vom Tabak Blatt und seinem Saft(a).
Differenzspektrum stellt das MLS-Spektrum (b) dieses Blattes dar.

In den Blattsäften ist das MLS-Niveau wesentlich niedriger, was im Differenzspektrum auch ermöglicht, den MLS-Beitrag (die Abb.7.2.16) zu extrahieren. Das Spektrum des Saftes der Tabak Blätter wurde in einer Küvette mit einer Dicke von 400 μm gemessen, was eine typische Blattdicke etwas übertrifft. Deswegen sind die Wasserabsorptionsbanden 1450 und 1930 nm intensiver als im Blatt. Auffällig ist, daß die Form der breiten MLS-Banden, die als Differenzspektren der Extinktion des ganzen Blattes und seines Saftes bzw. des wasserinfiltrierten Blattes extrahiert wurden, in beiden Fällen sehr ähnlich ist. Die extrahierten MLS-Spektren von Tabak und Rizinus Blättern sind einander auch sehr ähnlich (Abb.7.2.17). Es spricht für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse.

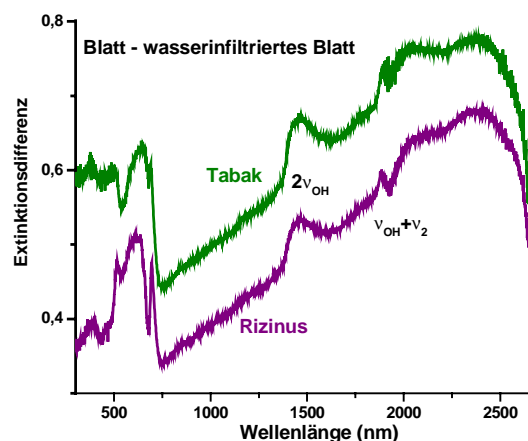


Abb.7.2.17: Vergleich der MLS-Spektren von Tabak und Rizinus Blättern.

Es wurden auch die Einhüllenden der MLS-Spektren für die Tabak und Rizinus Blätter sowie für die wasserinfiltrierten Blätter ermittelt. Dafür wurden in den Transmissionspektren der Blätter die von den Absorptionsbanden des Wassers und des Chlorophylls freien Bereichen ausgesucht. Danach wurden diese Werte des MLS-Niveaus durch ein Polynom 6. Ordnung approximiert. Die erhaltenen Ergebnisse für Tabak und Rizinus sind in Abb.7.2.18 gezeigt. Sie haben ein Maximum im Bereich 2200 nm, wo die meisten Veränderungen des MLS-Spektrums von den wasserinfiltrierten Blättern beobachtet werden.

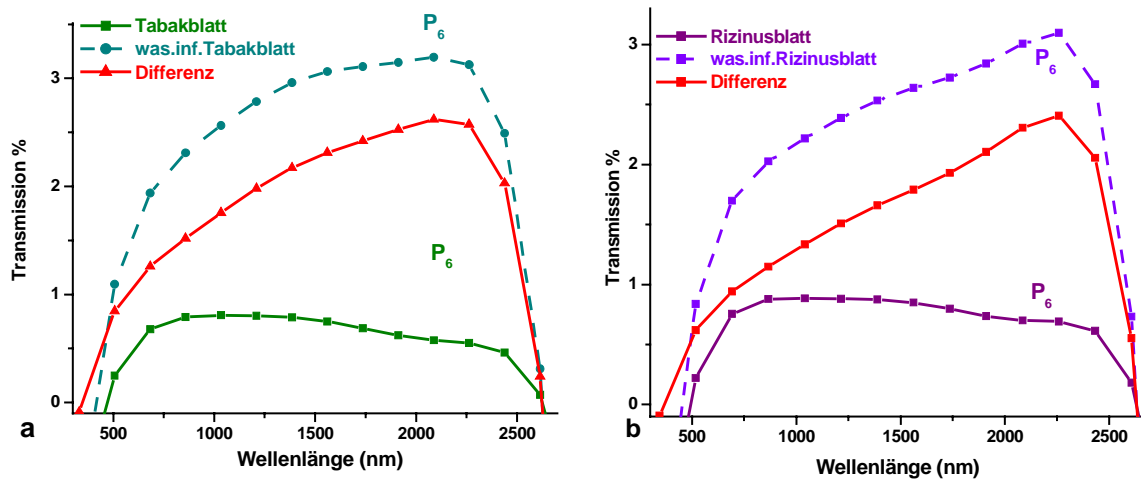


Abb.7.2.18: Einhüllenden der Transmissionsspektren von nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Tabak (a) und Rizinus Blättern (b) und ihre Differenzspektren, die die MLS-Spektren entsprechen.

Der größte Beitrag der MLS in die Durchsichtigkeit der Blätter, wird im Bereich 2000-2500 nm beobachtet, wo die Blätter die kleinste Durchsichtigkeit haben. Für wasserinfiltrierte Blätter wird der maximale Einfluß der MLS auf die Durchsichtigkeit des Blattes im kurzwelligen Bereich (800-1700 nm) beobachtet. Insgesamt verschiebt sich der maximale Beitrag der MLS nach der Wasserinfiltration des Blattes aus dem Bereich 2,2 μm bis zu 1 μm . Es kann auf eine Größenverminderung der charakteristischen Inhomogenität in der Blattstruktur hindeuten.

Die Verstärkungskoeffizienten der Wasserbanden aufgrund der Verlängerung der Weglänge des gestreuten Lichtes können gefunden werden, indem verschiedene MLS-Niveaus in den Blättern vor und nach der Wasserinfiltration benutzt werden. Die Differenzen der extrahierten Wasserabsorptionsbanden für die mesophyten Blätter vor und nach der Wasserinfiltration sind in Abb.7.2.19 dargestellt. Die Bedingungen, die der Kompensation der Verstärkungskoeffizienten der Absorptionsbande nach der Wasserinfiltration fast ähnlich sind, werden für die Mode $\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ beobachtet. Dabei wird im Tabak Blatt noch nicht volle Kompensation erreicht, und für Rizinus ist eine Überkompensation vorhanden.

Für den korrekten Vergleich der Größe der Wasserbanden in den Blättern vor und nach der Wasserinfiltration muß man verschiedene Wassermengen in den Blättern berücksichtigen. Dafür muß man die Wasserabsorptionsbanden der wasserinfiltrierten Blätter verringern, indem man sie durch den Infiltrationsfaktor dividiert. Dieser Faktor wurde mittels des Abwiegens der Blätter vor und nach der Wasserinfiltration und auch nach dem vollen Blattaustrocknen bestimmt. Für diese Experimentenserie sind die Koeffizienten der Wasserinfiltration von Tabak und Rizinus Blättern entsprechend 1,22 und 1,36 gleich.

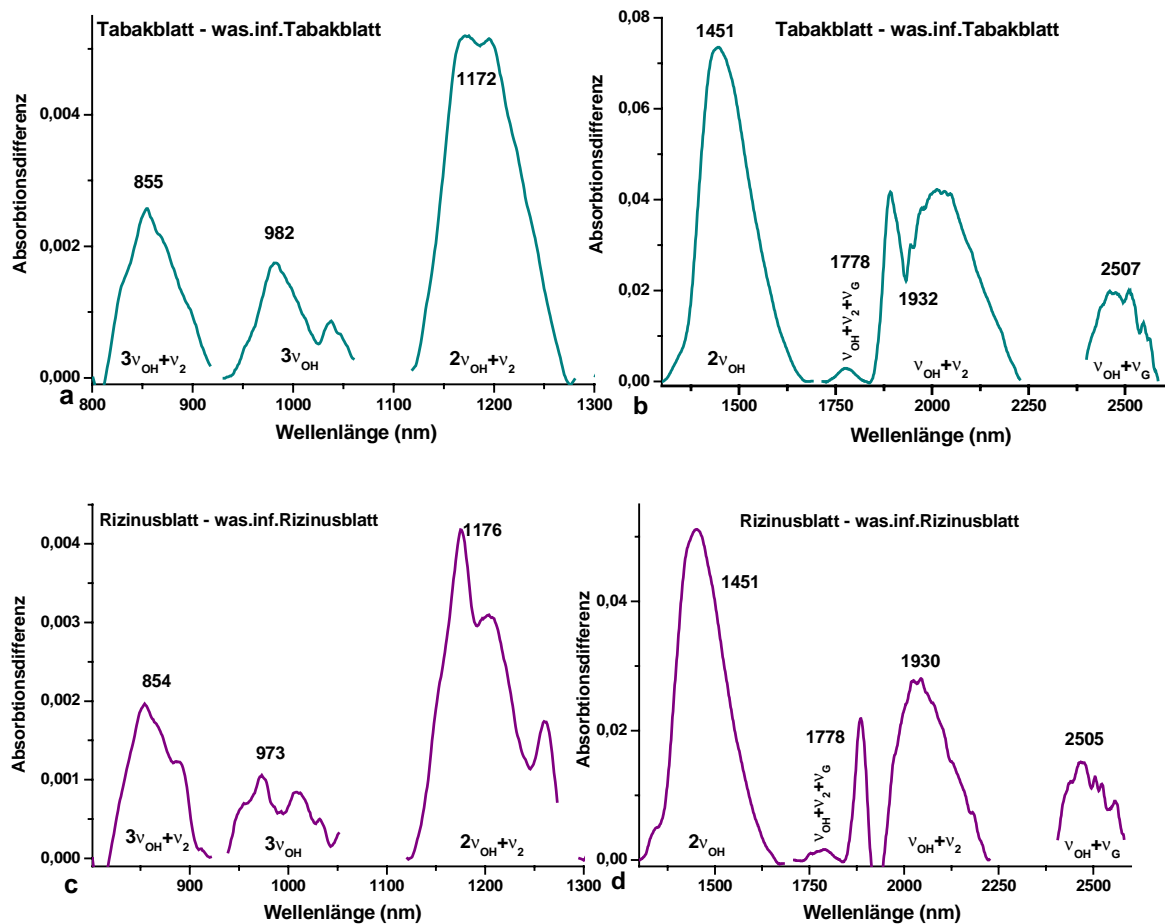


Abb.7.2.19: Differenzen der Absorptionsbanden von nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Tabak (a, b) und Rizinus Blättern (c, d).

In Abb.7.2.20 sind die Formen der extrahierten Wasserabsorptionsbanden in den Tabak und Rizinus Blättern vor (Kurve 1) und nach ihrer Wasserinfiltration (Kurve 2), und auch die auf den Koeffizienten der Wasserinfiltration korrigierten Banden (Kurve 3) dargestellt. Durch das Dividieren der Ausgangsbanden des Wassers im Blatt (1) durch die korrigierten Banden (3) wurden die gesuchten Verstärkungskoeffizienten der Absorptionsbanden aufgrund der MLS ausgerechnet (Tabelle 7.2.1). Die spektralen Abhängigkeiten dieser Koeffizienten (Kurve 4) sind ebenfalls in Abb.7.2.20 gezeigt. Wie es auch zu erwarten ist, wächst der Verstärkungskoeffizient auf den Flanken stärker als im Maximum der Bande. Im Bereich der Mode $2v_{OH}+v_2$ des Tabak Blattes bleibt dieser Koeffizient nahezu konstant, und für die Mode $3v_{OH}$ erreicht er einen kleinen Maximum nah zur Bandenmitte, was auch mit dem Auftreten der Feinstruktur verbunden ist. Für das Rizinus Blatt sind Oszillationen im Verstärkungskoeffizienten der kurzwelligen Wasserbanden aufgrund ihrer starken Feinstruktur charakteristisch.

Es wird eine Tendenz zur Erhöhung der Werte von berechneten Verstärkungskoeffizienten für die kurzwelligen Wasserbanden beobachtet. Diese könnte durch eine Vergrößerung der effektiven Anzahl der Streuakten der kurzwelligen gegenüber zu den langwellen Lichtstrahlen bedingt sein.

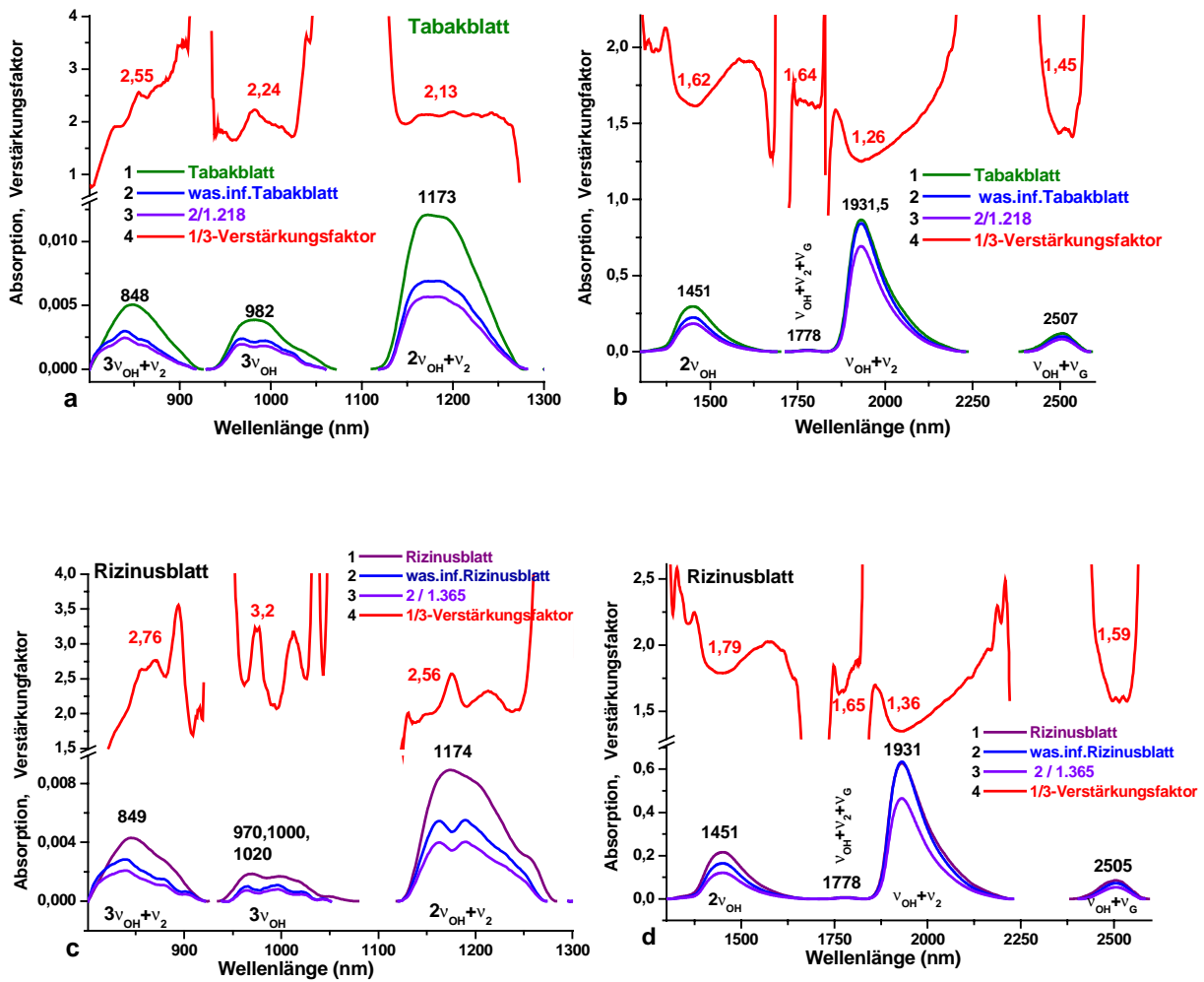


Abb. 7.2.20: Ermittlung der Verstärkungskoeffizienten für die Wasserabsorptionsbanden eines Tabak(a, b) und Rizinus Blattes (c, d).

λ (nm)	Tabak Blatt	Rizinus Blatt
850	2.5506	2.7645
970	2.2436	2.4500
1174	2.1327	2.5623
1451	1.6164	1.7948
1778	1.6421	1.6491
1930	1.2586	1.3585
2501	1.4549	1.5901

Tabelle 7.2.1: Verstärkungskoeffizienten K der Wasserabsorptionsbanden von Tabak und Rizinus Blättern.

Unter Berücksichtigung des Verstärkungskoeffizientes $K=1,6164$ der Bande bei 1460 nm für Tabak Blatt kann den korrigierten Wert der effektiven Wasserdicke im Blattgewebe als

$$d_{\text{eff}}^0 = d_{\text{eff}} / K = 0,41$$

ausgerechnet werden. Dieser Wert d_{eff}^0 ist nahezu gleich dem realen Wert, der mittels der gravimetrische Methode berechnet wurde

$$d = \Delta m / (\rho S),$$

wobei $\Delta m = m_f - m_{tr}$, $m_{f,tr}$ die Masse der frischen und trockenen Blätter, ρ die spezifische Dichte von Wasser und S die Blattfläche sind.

In wasserinfiltrierten Blättern verringert sich der MLS-Beitrag, wird aber nicht vollständig ausgeschlossen. Deswegen wurde zusätzlich noch eine andere Methode für die experimentelle Bestimmung der Verstärkungskoeffizienten der Banden ausprobiert. Eine Verminderung der Verstärkung von Wasserabsorptionsbanden bei der MLS-Abschwächung infolge der Wasserinfiltration kann durch einen dabei erhöhten Wassergehalt im Blatt kompensiert werden. Bei der Zunahme der Durchsichtigkeit von Blättern bis zu 3% und der Vergrößerung des Wassergehaltes bis zu 20-30% wird solche Kompensation der entgegengesetzten Tendenzen im Bereich des Kombinationstones $\nu_{OH} + \nu_2$ (1930 nm) beobachtet. Wie aus Abb.7.2.21 ersichtlich ist, hat die Bande $\nu_{OH} + \nu_2$ dabei eine Delle im Zentrum. Solche charakteristische Form des Spektrums ist durch eine große Verstärkung der Wasserbanden auf den Flanken und die Vergrößerung ihrer Halbwertsbreiten bei der Mehrfachlichtstreuung bedingt. Bei der Wasserinfiltration des Blattes wird die Absorptionsbande schmaler, woraus ergibt sich eine tiefe Delle in Differenzbanden.

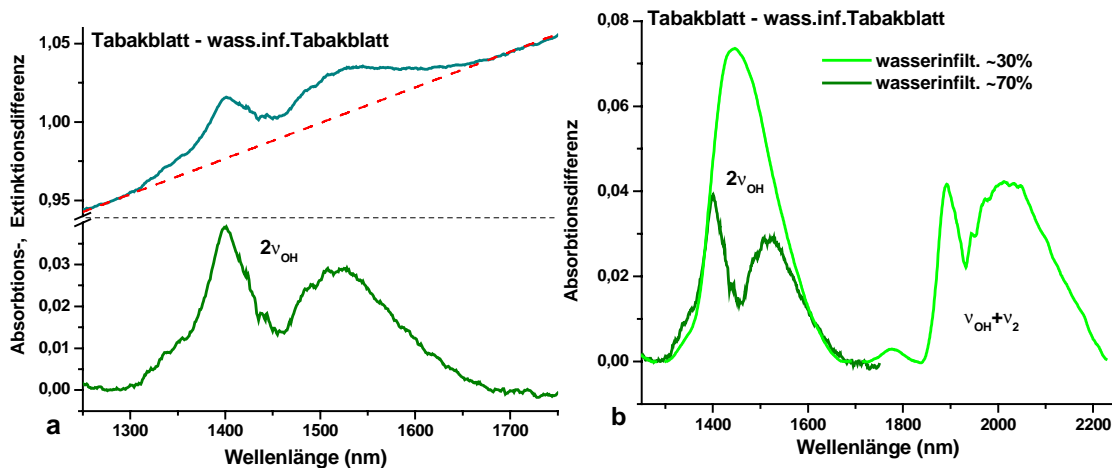


Abb.7.2.21: Veränderung der Form der Differenzspektren von nichtinfiltriertem und wasserinfiltriertem Tabak Blatt bei verschiedenem Grad der Wasserinfiltration.

Bei der genauen Kompensation der MLS-Beiträge im Bandenmaximum ist der Verstärkungskoeffizient der Wasserbanden dem Koeffizienten der Wasserinfiltration des Blattes gleich. Damit ist der Verstärkungskoeffizient ~ 1.25 für die Banden 1930 nm. Dabei ist der Koeffizient der effektiven Verstärkung für die Bande $2\nu_{OH}$ größer, was der Steigerung der Bande im Differenzspektrum entspricht. Bei der Erhöhung des Wasserinfiltrationsgrades bis zu 1,7 wird solche Kompensation im Bereich des $2\nu_{OH}$ Obertones beobachtet, dabei ein Minimum im Bandenzentrum entsteht (Abb.7.2.21b). So ist der Verstärkungskoeffizient der Wasserbande 1450 nm im Blatt aufgrund der MLS ca. 1,7. Die Vergrößerung des Wassergehaltes im infiltrierten Blatt übersteigt die Verstärkung der Bande 1930 nm, dabei ist eine tiefe Delle im Differenzspektrum zu beobachten. Die auf zwei Weisen bestimmten Verstärkungskoeffizienten der Wasserbanden stimmen miteinander gut überein. Die erhaltenen Verstärkungskoeffizienten wurden für eine genaue quantitative Bestimmung des Wassergehaltes in den Blättern aus den spektralen Daten verwendet.

7.2.5. Spektrale Visualisierung der Blattwasserverteilung

Die in Biologie verwendeten nicht zerstörenden Methoden für die Bestimmung des Wassergehaltes im Pflanzengewebe beruhen auf der Absorption von Mikrowellen, der IR- oder β -Strahlung sowie auf der Anwendung der NMR-Technik oder der Messung des elektrischen Blattwiderstandes. In der Praxis sind die einfachen traditionellen Methoden der Messung des osmotischen Drucks oder des Turgor-Wasserpotentials sehr verbreitet. Die in dieser Arbeit entwickelten neuen spektralen Methoden der Bildverarbeitung und eine Anwendung der hoch auflösenden CCD-Kameras von VIS und NIR Spektralbereichen macht die Spektralanalyse für die Messung des Wassergehaltes und der -verteilung in Pflanzenblättern bevorzugt.

Mit der Verwendung des Absorptionsfaktors der 1 mm dicke Wasserschicht und der berechneten Verstärkungskoeffizienten von Wasserbanden kann von den Absorption Bildern zu den Profilbildern der Wasserverteilung über die Blattfläche übergegangen werden. Die Genauigkeit der verwendeten Methode wurde mit Hilfe der mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette kontrolliert. In Abb.7.2.22 ist die Ermittlung der Wasserprofile für das reife Tabak Feldblatt dargestellt. Die Densitogramme der Wasserprofile für das ganze Bild (Abb.7.2.22a) und für seine Teile, die dem Blattgewebe (Abb.7.2.22b), der Küvette mit dem Wasser (Abb.7.2.22c) und dem Bereich der Hauptader (Abb.7.2.22d) entsprechen, sind rechts gezeigt.

Absorptionsbild des Tabakblattes bei 1200 nm und Histogramme der Blattteile

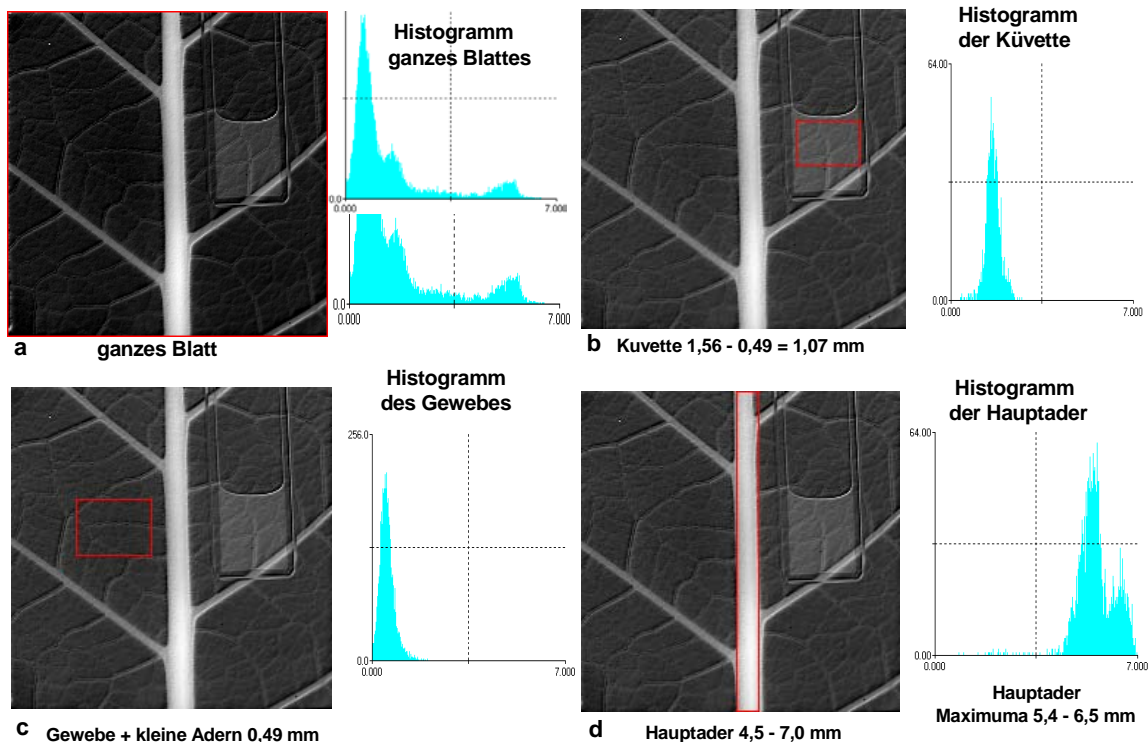


Abb.7.2.22: Vergleich der Densitogramme der effektiven Wasserdicke von verschiedenen Teilen des Absorptionbildes eines Tabak Feldblatest und einer 1 mm dicke Küvette: Densitogramm von ganzem Bild (a), von der Küvette (b), vom Blattgewebe (c) und von der Hauptader (d).

Das Densitogramm des Bildes vom ganzen Blatt hat drei charakteristische Maxima. Das Hauptmaximum entspricht dem Blattgewebe und kleinen Adern. Andere zwei Maxima sind viel kleiner, deshalb wird dieser Teil des Densitogramms vergrößert. Das zweite Maximum entspricht der Küvette mit dem Wasser, und das dritte Maximum – den Blattadern. Der Differenzwert in der Lage zwei ersten Maxima von 1,07 mm entspricht der Dicke der Kontrollküvette. Die effektive Wasserdicke im Blattgewebe und in den kleinen Adern ist 0,49 mm gleich, und für die Hauptader beträgt das entsprechende Maximum 4,5-7 mm.

Die Profilbilder der Wasserverteilung über die Fläche der Blätter von Tabak, Rizinus und Kalanchoe *Blossfeldiana* sind entsprechend in Abb.7.2.23-7.2.25 gezeigt. In dieser Abbildungen sind die Profile des Wassergehaltes gezeigt, die den bestimmten Zeilen und Spalten des Bildes entsprechen.

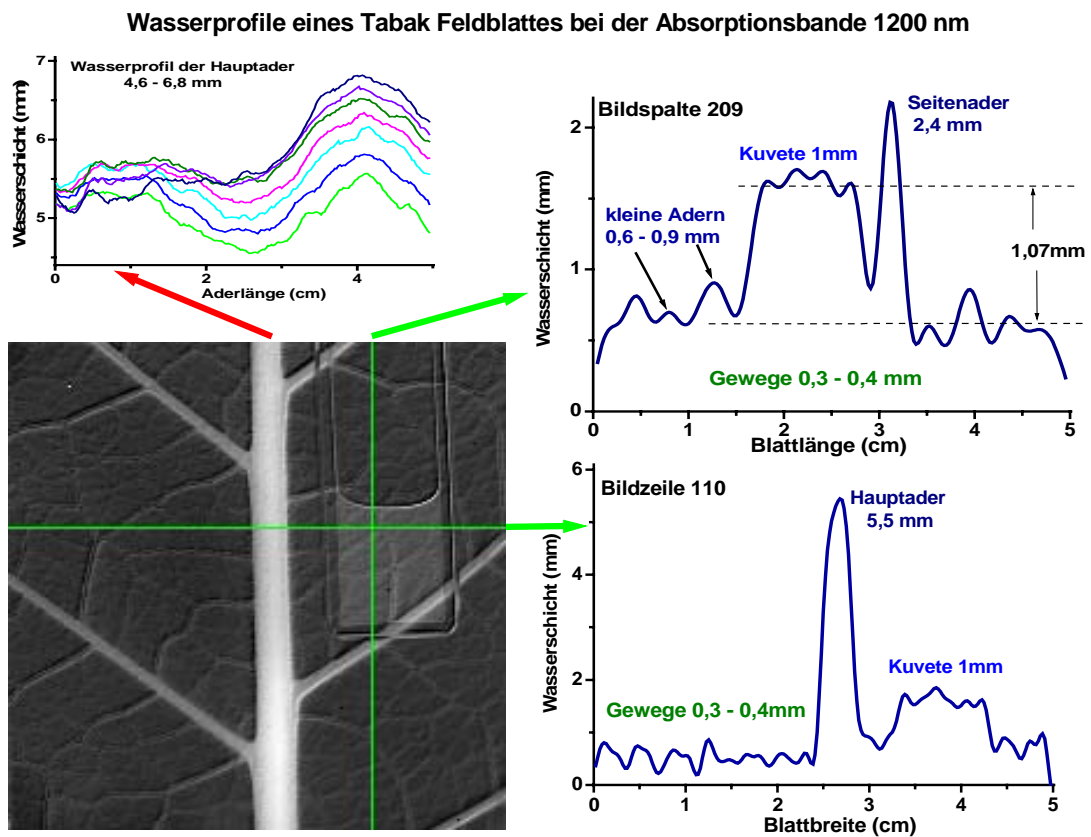


Abb. 7.2.23: Spektrale Visualisierung (bei 1200 nm) der effektiven Wasserdicken eines Tabak Feldblattes. Zeilen- und Spalteninspektor des Profilbildes zeigen die digitale Werte des Wassergehaltes (Wasserprofile) über die Blattoberfläche.

Für ein dickes Tabak Feldblatt wurden die Profilbilder von Wasser im Spektralbereich der Bande $2\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ ($\lambda \sim 1200$ nm) bestimmt. Wie aus Abbildung 7.2.23 ersichtlich ist, entspricht der Kontrollküvette die 1 mm dicke Wasserschicht, dem Blatt-gewebe 0,3-0,4 mm, den kleinen Adern 0,6-0,9 mm, den Seitenadern $\sim 2,4$ mm, und den Hauptadern bis zu 5,5 mm dicke Wasserschicht. Es wurde eine nichtlineare Veränderung des Wassergehaltes entlang der Hauptadern im Tabak Blatt festgestellt. Die Maxima des Wassergehaltes wurden an den Stellen der Abzweigung der Seitenadern beobachtet.

Für ein Rizinus Blatt wurden die Wasserprofile im Bereich der $2V_{OH}$ Bande bei 1420 nm ermittelt (Abb.7.2.24). Das Rizinus Blatt enthält im Blattgewebe 0,2-0,24 mm, in den Hauptadern 1,42 mm, in kleinen Adern 0,3-0,5 mm dicke Wasserschicht, dabei entspricht die Wasserschicht in der Kontrollküvette genau 1 mm. Für Rizinus wurde die nicht lineare Wasserverteilung entlang der Hauptader auch festgestellt. In den Profilbildern des Blattwassers äußern sich deutlich die Ader verschiedener Niveaus.

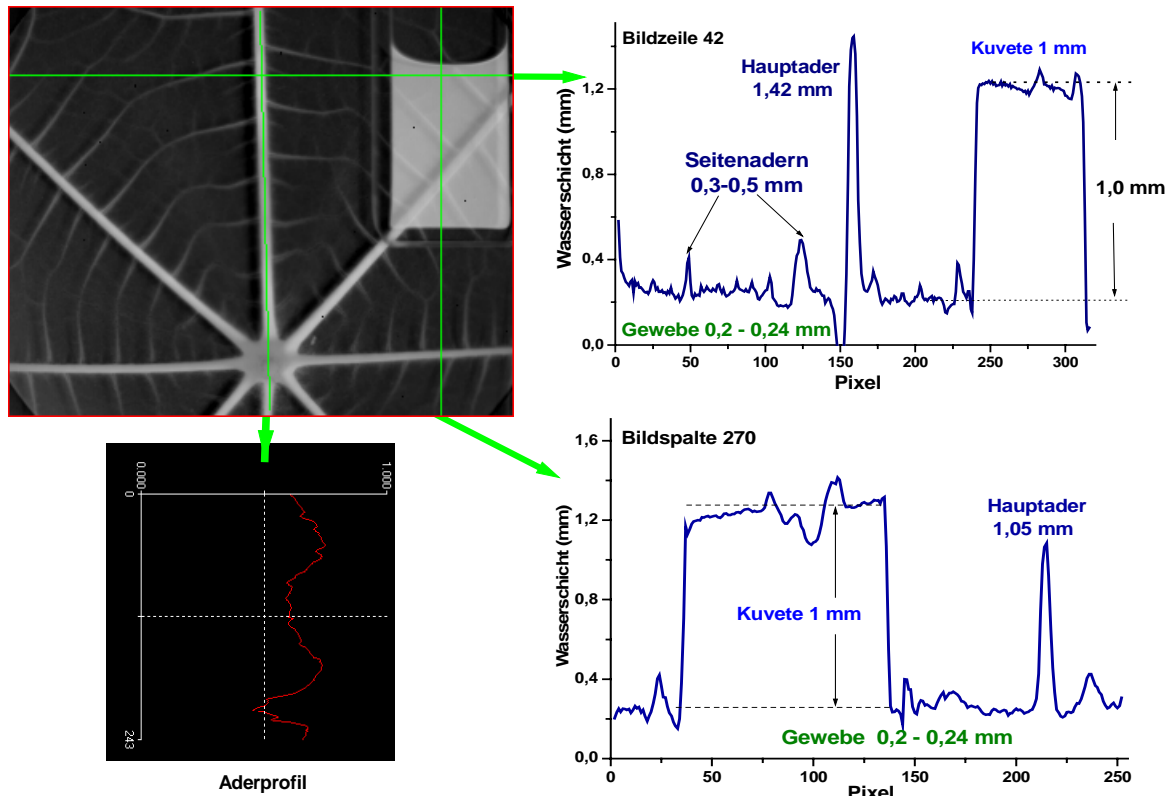


Abb.7.2.24: Profilbild der effektiven Wasserdicken über die Rizinus Blattoberfläche.

Für das junge Blatt von Kalanchoe ist die Wasserverteilung in Abb.7.2.25 dargestellt. Auch hier ist der Wassergehalt in der Kontrollküvette nahezu gleich 1 mm. Der Wassergehalt entlang der Hauptader des Blattes nimmt zur Blattspitze ab. Die Querprofile zeigen eine Verminderung der Wassermenge zur Blattperipherie. Dabei sind in den Querprofilen die Seitenadern des sukkulenten Blattes gut sichtbar. In den Profilbildern des ganzen Rizinus und Tabak Blatt ist auch eine gleichmäßige Abnahme des Wassergehaltes zum Blattrand hin zu beobachten.

Damit ermöglichen die Methoden der bildgebenden Spektroskopie eine detaillierte Profilkarte der Wasserverteilung über die Blattfläche zu ermitteln. Für die Ablauf der physiologischen Prozesse in Pflanzenblättern spielen nicht nur die Wassermenge; sondern auch die energetischen Wasserzustände eine große Rolle. Den Untersuchungen von Wasserzuständen ist das nächste Kapitel gewidmet.

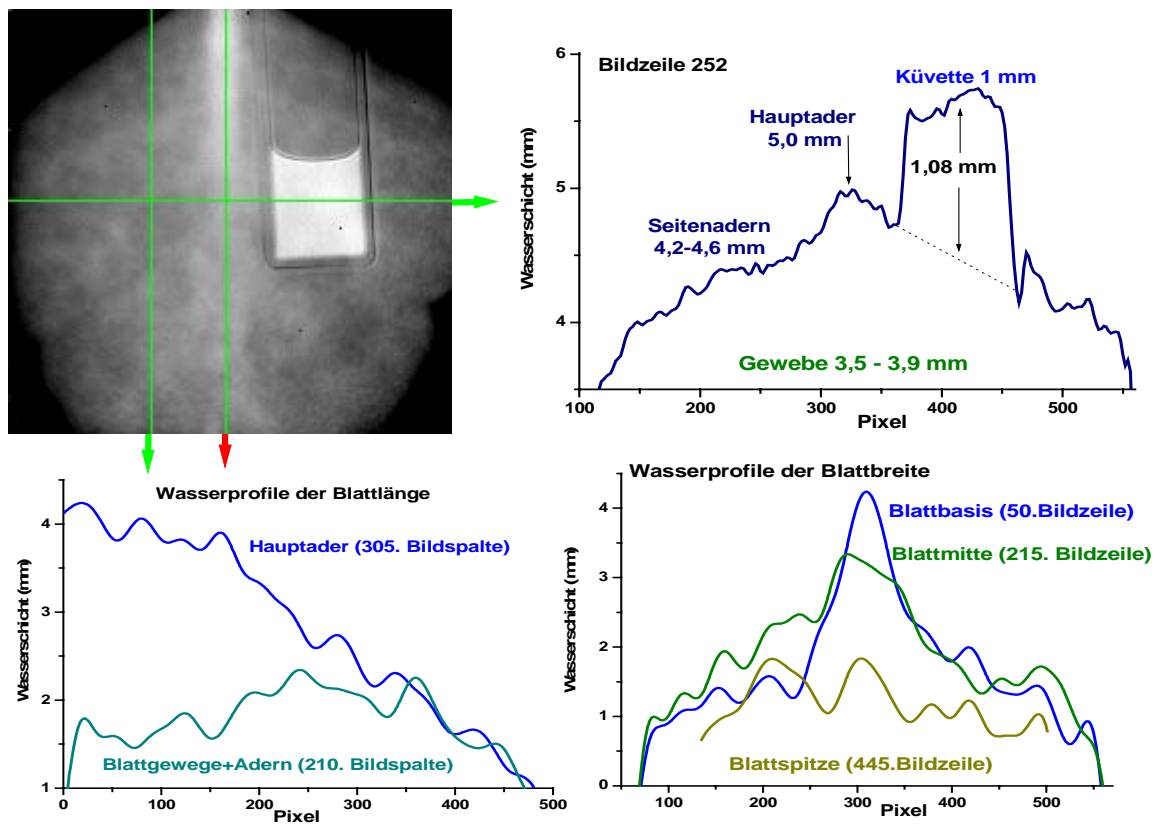


Abb. 7.2.25: Profilbild der effektiven Wasserdicken über die Kalanchoe Blattoberfläche.

7.3. Spektroskopie der verschiedenen Wasserzustände von Pflanzenblättern

Für die Pflanzenfunktionen sind neben dem Wassergehalt noch weitere Parameter, wie z.B. der Wasserzustand von Interesse. Seit einer langen Zeit unterteilt man das Wasser in den Pflanzen in freies und gebundenes Wasser [Lösch 2001]. Aber es wurden bis vor kurzem noch keine eindeutige Kriterien des Unterschiedes festgestellt. Üblicherweise werden verschiedene Formen des Blattwassers unterschieden: das Transportwasser in den leitenden Bündeln, das in den Vakuolen deponierte Wasser, das Konstitutionswasser und Hydratwasser. Es wird behauptet, daß das freie Wasser in den Pflanzen die Eigenschaften nahe den Eigenschaften des reinen (destillierten) Wassers hat, und das gebundene Wasser geänderte Eigenschaften aufweist [Gusev 1974]. Das gebundene Wasser ist schwieriger zu verdampfen, es gefriert bei -30°C und hat eine herabgesetzte auflösende Fähigkeit.

Der Begriff „freies Wasser“ ist unglücklich gewählt, da im Kondenzzustand alle Wasserarten in gewissem Sinne mehr oder weniger gebunden sind, weil die Wasserstoffbrücken relativ stark sind. Im reinen flüssigen Wasser sind fast keine freien (monomeren) Moleküle vorhanden, die mit den anderen Molekülen nicht in einem einheitlichen Wasserstoffbrücken-Netz gebunden sind. Es wäre korrekter über einen Grad gebundenes Wasserzustandes im Pflanzengewebe im Vergleich zum destillierten Wasser zu sprechen. In den meisten Arbeiten wird unter dem Wasserzustand solche physikalischen Eigenschaften verstanden, die durch thermische Bewegung der Moleküle bestimmt sind [Slavik 1974; Larcher 1994]. Unserer Meinung nach muß ein energetischen Wasserzustand (EWZ) vor allem durch ein entsprechendes energetisches Spektrum charakterisiert werden, welches ein Komplex der Schwingungszustände und elektronischer Zustände umfaßt. Eine solche Definition des Wasserzustandes ist allgemein und entsprechende spektral-energetische Charakteristiken können gemessen werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedene EWZ entdeckt und eindeutige spektroskopische Kriterien für eine Identifizierung der EWZ in Pflanzenblättern festgestellt. Dafür wurden die umfangreiche Analyse der Transmissions- und Reflexionsspektren sowie Untersuchungen der Wasserproben und Pflanzenblätter mittels der entwickelten Methoden der bildgebende Spektroskopie durchgeführt. Für das Studium der Spektren von EWZ wurde eine Methodik der Verhältnisse der Schwingungsmoden verschiedener Serien vorgeschlagen. Die EWZ der Pflanzenblätter wurden mit Hilfe der Analyse des Verhältnisses der Absorptionsspektren und -bilder untersucht. Dabei wurden EWZ in Blättern verschiedener Pflanzen und bei verschiedenen Stadien der Blattentwicklung studiert. Ebenfalls wurde eine Transformation der EWZ in Blättern im Laufe der Zeit bzw. bei physiologischen Prozessen gezeigt. Zum ersten Mal wurden die Raumspektren des Wassers in den Pflanzenblättern ermittelt, die gegen eine Veränderung des Wasserzustandes empfindlich sind.

7.3.1. Entdeckung der Wasserzustände in Pflanzenblättern

Die Wasserzustände äußern sich durch einen signifikanten Unterschied der Schwingungsspektren im Bereich der höchsten Schwingungsbanden $3\nu_{\text{OH}}$ und $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ und durch eine Variation des Intensitätsverhältnisses der Banden von verschiedenen spektralen Serien. Als Grundlage für eine Klassifizierung von EWZ dient eine Änderung der Intensität und Frequenz von Maxima der Schwingungsbanden. Die Veränderung der Bandenintensität ist mit dem Verhalten des elektronischen Subsystems verbunden und ist empfindlich gegen eine Oszillation des Wasserzustandes. Für Wasser in Pflanzenblättern ist eine Umverteilung der Intensitäten zwischen spektralen Serien der Obertöne

$n_{V_{OH}}$ und der Kombinationstöne $n_{V_{OH}+V_2}$ charakteristisch. In der Regel wird eine Verstärkung des Wasserstoffbrücken-Netzes im Wasser durch eine Abschwächung der Obertöne und eine Verstärkung der Kombinationstöne, sowie durch eine Verschiebung der Spektralbanden zum langwelligeren Bereich (zu niedrigen Energien) begleitet, was einer Energiesenkung der Anregungen entspricht.

Veränderungen der Schwingungsmoden des Blattwassers

Zweiter Wasserzustand in Pflanzenblättern

Wie es bereits beschrieben ist, wurden wesentliche Unterschiede der Absorptionsbanden von Blattwasser und destilliertem Wasser im Bereich der $3V_{OH}$, $2V_{OH}+V_2$ und $3V_{OH}+V_2$ Moden beobachtet. Dieses wichtige Ergebnis für Tabak und Rizinus Blätter ist in Abb.7.3.1 gezeigt. Die Absorptionsbande des $2V_{OH}$ Obertones des Blattwassers ändert sich wenig im Vergleich zu der von destilliertem Wasser, aber die Banden $2V_{OH}+V_2$ und $3V_{OH}+V_2$ erfahren beträchtliche Veränderungen.

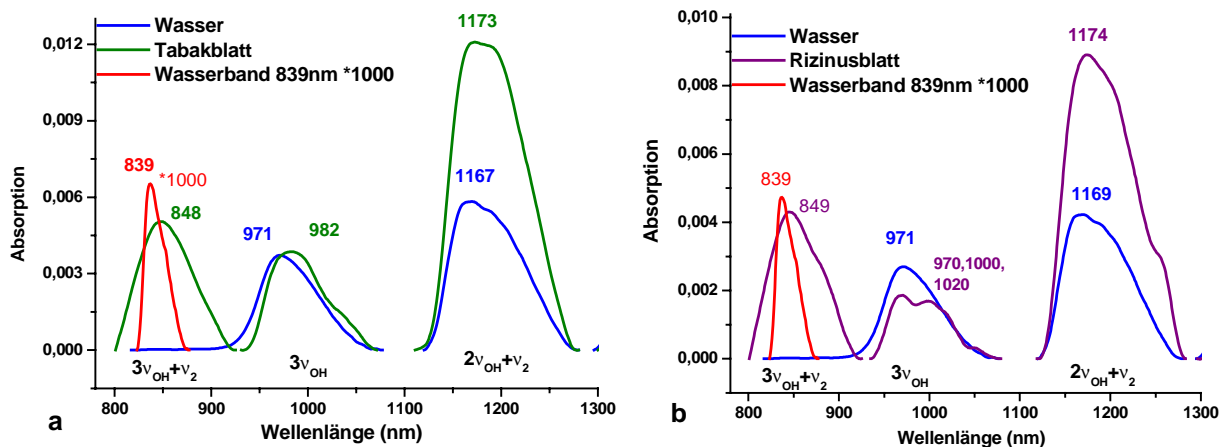


Abb. 7.3.1: Der 2. Wasserzustand: Vergleich der höchsten Schwingungsbanden der Wasserabsorption von Tabak(a) und Rizinus Blatt (b) mit dem destillierten Wasser.

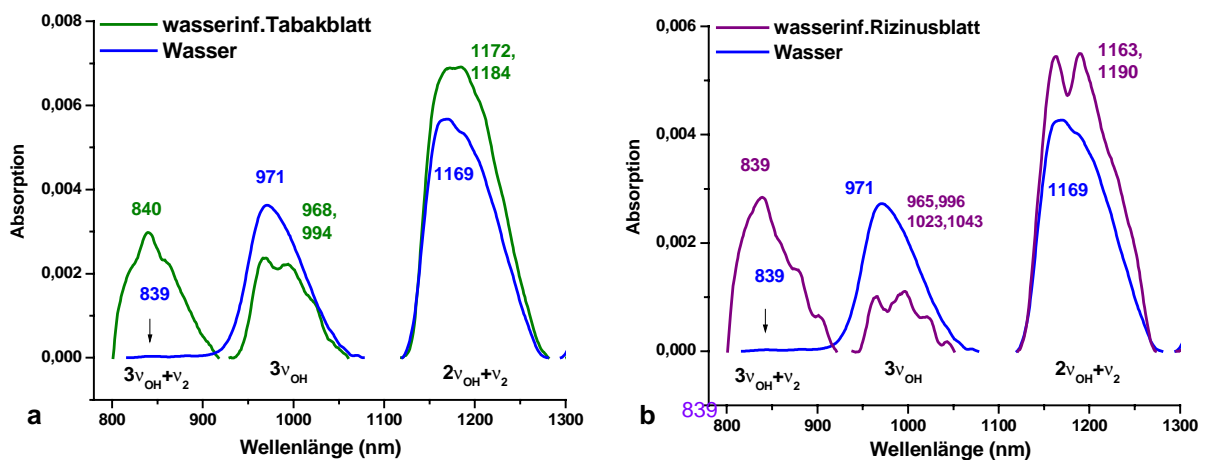


Abb. 7.3.2: Der 2. Wasserzustand: Vergleich der Absorptionsbanden von wasserinfiltrierten Tabak(a) und Rizinus Blatt (b) mit dem destillierten Wasser.

In Tabak und Rizinus Blättern ist die $2\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Absorptionsbande bei 1169 nm fast um ein 2faches verstärkt, was nur teilweise durch die MLS verursacht sein könnte. Die wesentlich größere Intensitätsänderungen wurden für den $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Kombinationston des Blattwassers beobachtet. Die Intensität dieser Absorptionsbande ist für destilliertes Wasser um 577faches kleiner, als die Intensität des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones, und ihre integrale Intensität unterscheidet sich um mehr als 1200mal. Im Gegensatz dazu wurde für Blattwasser eine umgekehrte Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses dieser Spektralbanden gemessen. Das Maximum der $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Absorptionsbande bei 848 nm ist wesentlich intensiver gegenüber zu dem des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones bei 971 nm. Die Intensität der $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Bande des Blattwassers ist um das 775fache größer als die für derselbe Bande des destillierten Wassers der gleichen effektiven Dicke. Ihre integrale Intensität unterscheidet sich um mehr als einen Faktor 3800. Für den Vergleich sind in Abb.7.3.1a diese Absorptionsbande des Blattwassers und die mit 1000 multiplizierte Absorptionsbande 839 nm des destillierten Wassers zusammen gezeigt. Zweifellos wurde eine solche gigantische Intensitätssteigerung der Absorptionsbande nicht nur durch den Einfluß der MLS bedingt sondern stellt einen neuen Effekt dar.

Eine ähnliche anomal große Intensitätssteigerung des $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Kombinationstones wurde auch in Absorptionsspektren der wasserinfiltrierten Tabak und Rizinus Blätter beobachtet (Abb.7.3.2). Die Intensität der Absorptionsbande bei 849 nm steigt für das Rizinus Blatt im Vergleich zu der effektiven Dicke von 173,2 μm des destillierten Wassers, um mehr als das 900fache. Für wasserinfiltrierte Blätter nimmt die Intensität der $2\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Mode geringfügig zu. Die Intensität der Absorptionsbande der $2\nu_{\text{OH}}$ und $3\nu_{\text{OH}}$ Obertöne nimmt im Vergleich zu denselben Absorptionsbanden des destillierten Wassers ab. kann sein infolge einer Abschwächung der Mehrfachlichtstreuung. Aber die gigantische Verstärkung der Absorptionsbande des $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Kombinationstones bleibt auch in den Spektren der wasserinfiltrierten Tabak und Rizinus Blätter.

Das Extrahieren der Wasserabsorptionsbanden aus dem MLS-Untergrund in den Extinktionsspektren ist in Abb.7.3.3 dargestellt. Abbildung 7.3.4 zeigt den Vergleich der Extinktionsspektren und extrahierten Absorptionsbanden für das Gewebe von jungen, reifen und alten Tabak Blättern. Für Wasser im Gewebe der an Chlorophyll reichen, jungen und reifen Blätter ist ein Intensitätsausgleich der $3\nu_{\text{OH}}$ und $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Banden charakteristisch. Dagegen für das alte Blatt erkennt man eine schwache Intensitätsenkung der $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Bande und gleichzeitig eine Zunahme der $3\nu_{\text{OH}}$ und $2\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Banden.

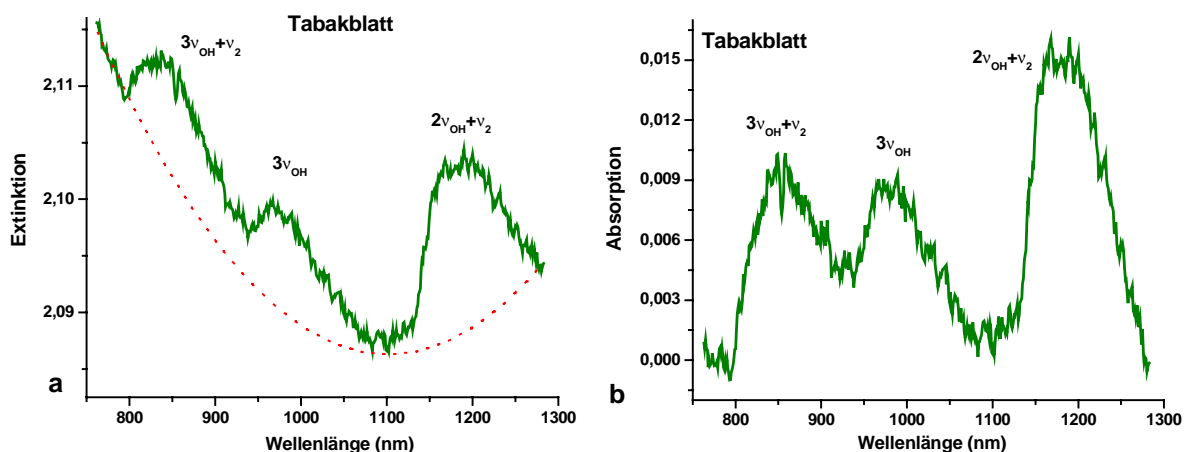


Abb.7.3.3: Extrahieren der Wasserabsorptionsbanden aus dem Extinktionsspektrum (a) und extrahierte Absorptionsbanden (b) eines Tabak Blattes.

Wie die Ergebnisse der zusätzlichen Experimente gezeigt haben, können große Veränderungen der Intensität der Schwingungsmoden nicht durch die Auflösung der organischen Stoffe oder Salze im Wasser erklärt werden. Es ermöglichte, diesen Wasserzustand in Pflanzenblättern als einen veränderten zweiten Wasserzustand im Vergleich zum ersten Wasserzustand des freien destillierten Wasser zu klassifizieren.

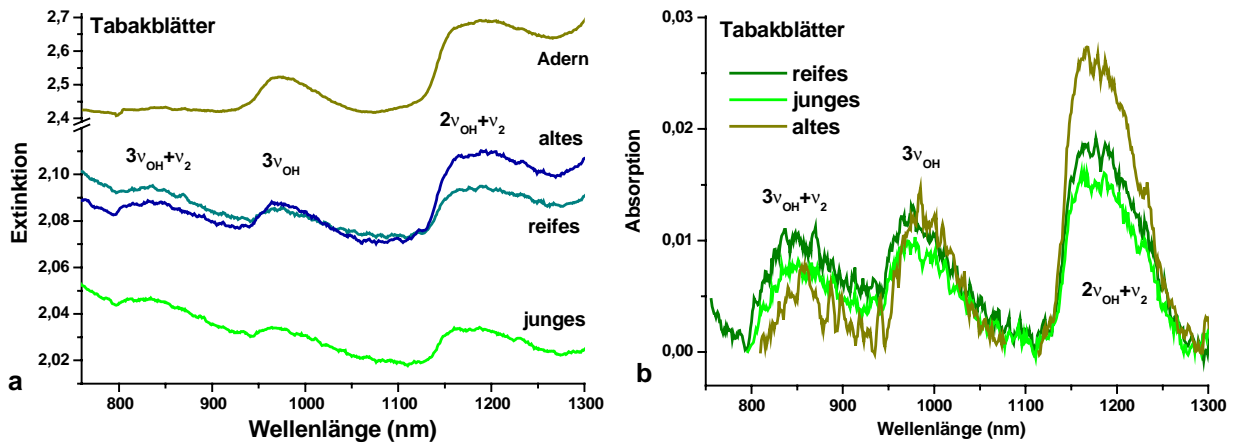


Abb. 7.3.4: Vergleich der Extinktionsspektren (a) und der extrahierten Wasserabsorptionsbanden (b) von jungen, reifen und alten Tabak Blättern.

Die Eigenschaften des Blattwassers des zweiten Zustandes sind möglicherweise durch die Wechselwirkung mit dem Chlorophyll bedingt, das zu einem Verschwinden der Bande des 3. Obertones $4v_{OH}$ und gleichzeitig zu einer gigantischen Verstärkung des Kombinationstones $3v_{OH}+v_2$ führt. Unter Berücksichtigung einer beträchtlichen Teilnahme des Wassers in den Photosynthese-Prozessen im Blattgewebe wäre es logisch den 2. Zustand des Blattwassers als biologisch aktiv zu bezeichnen. Der Effekt der gigantischen Steigerung der Absorptionsintensität bei 850 nm kann durch ein Paradox charakterisiert werden. Dieses Paradox besteht darin, daß solche Bandintensität der Absorption einer Wasserschicht in 24 und 28 cm dicken (!) Rizinus und Tabak Blättern entsprechen würde.

Außer einer wesentlichen Veränderung des Intensitätsverhältnisses verschiedener Töne und der Obertöne für den 2. Wasserzustand in einem Pflanzenblatt ändern sich die Frequenzen der Maxima und die Halbwertsbreiten der Absorptionsbanden (Abb.7.3.5).

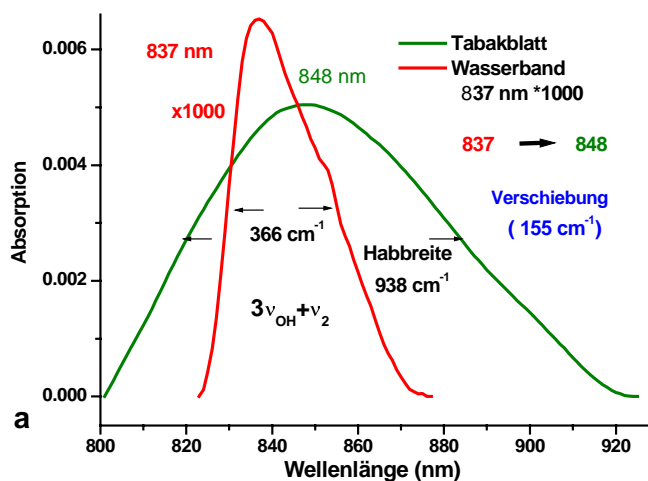


Abb. 7.3.5: Die gigantische Steigerung der Absorptionsbande $3v_{OH}+v_2$ (848nm) in einem Tabak Blatt im Vergleich zu destilliertem Wasser.

Zusätzlich zur Intensitätärderung wurde im Spektrum der mesophyten Blättern eine Verschiebung der Absorptionsbanden beobachtet. Die Wasserbanden vom Tabak Blatt verschieben sich zu langwelligem Bereich (zu niedrigen Energien) bezüglich der Absorptionsbanden von destilliertem Wasser. Dies entspricht einer Senkung des Energieniveaus der entsprechenden Schwingungsmoden und zugleich einer Vergrößerung der zwischenmolekularen Wechselwirkungskräfte der Wassermoleküle. Es wird eine Tendenz der größere Verschiebung der Absorptionsbanden mit der Zunahme der Mode-Ordnung beobachtet. Für die Moden $\nu_{OH}+\nu_2$, $2\nu_{OH}$, $2\nu_{OH}+\nu_2$, $3\nu_{OH}$ und $3\nu_{OH}+\nu_2$ im Tabak Blatt sind die Verschiebungen der Frequenzen der Moden 4 cm^{-1} , $9,5\text{ cm}^{-1}$, $29,2\text{ cm}^{-1}$, $115,4\text{ cm}^{-1}$ und 155 cm^{-1} entsprechend gleich. Die Wasserabsorptionsbande $3\nu_{OH}+\nu_2$ hat außer einer gigantischen Intensitätszunahme und großen Frequenzverschiebung auch eine wesentliche Ausdehnung. Die Halbwertsbreite dieser Absorptionsbande im destillierten Wasser ist 366 cm^{-1} gleich und wächst im Blatt bis zu 938 cm^{-1} (Abb.7.3.5).

Für biologisch aktiven Wasser wurde auch eine feine Struktur der Absorptionsbanden beobachtet (Abb.7.3.6a), was besonders sich für die wasserinfiltrierten Blätter äußert (Abb.7.3.2). Die feine Bandenstruktur weist ebenfalls auf den veränderten Wasserzustand hin. Im Blattwasser sind die "kollektiven" Absorptionsbanden des Netzes der Wasserstoffbrücken gut zu erkennen. Darauf weist die Intensitätszunahme des Kombinationstones $\nu_{OH}+\nu_2+\nu_G$ hin (Abb.7.3.6b). Die Frequenz dieser Mode nimmt beim Übergang von destilliertem Wasser zum Tabak Blatt von 440 bis 447 cm^{-1} zu.

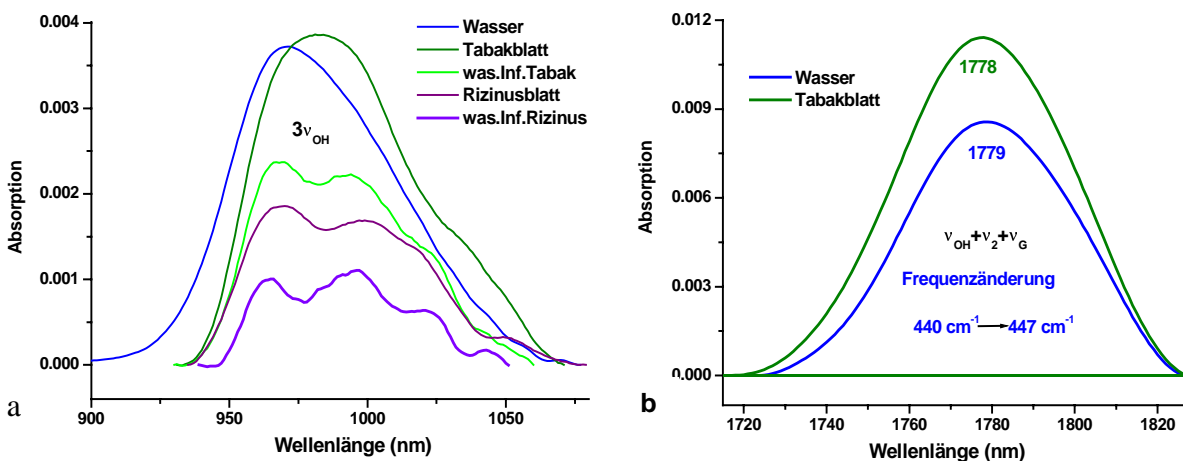


Abb.7.3.6: Vergleich der feinen Bandenstruktur des Obertones $3\nu_{OH}$ (970 nm) von Pflanzenblättern und von destilliertem Wasser(a). Vergleich der Banden der Kombinationstöne $\nu_{OH}+\nu_2+\nu_G$ vom destillierten Wasser und Tabak Blatt(b).

Erster Wasserzustand

Die Zustände des Blattwassers, die dem Zustand des destillierten Wassers ähnlich sind, wurden in den Blättern der sukkulenten Pflanzen beobachtet. Das Wasserspektrum vom dicken (4 mm) Kaktus ist dem Spektrum des destillierten Wassers ähnlich (Abb.7.3.7a). Zum Vergleich ist in Abb.7.3.7b das Spektrum des destillierten Wassers in der 10 cm dicken Küvette dargestellt. Die Lage und die Form der Absorptionsbande des 2. Obertones $3\nu_{OH}$ (971 nm) von destilliertem Wasser sind dem Spektrum vom Kaktus gleichartig. Wie auch für das destillierte Wasser wurden die schwächeren Absorptionsbanden $4\nu_{OH}$ (740 nm) und $3\nu_{OH}+\nu_2$ ($\sim 850\text{ nm}$) im Spektrum vom Kaktus beobachtet. Für das destillierte Kontrollwasser ist dieser Bereich des Spektrums im vergrößerten Maßstab gezeigt. Wie es schon in Kapitel 7.1 beschrieben wurde, ist der Oberton $4\nu_{OH}$ im Spektrum des destillierten Wassers intensiver als der Kombinationston $3\nu_{OH}+\nu_2$. Für das Wasserspektrum vom Kaktus ist dagegen die schwache Steigerung der Intensität des Kombinationstones $3\nu_{OH}+\nu_2$ und die Abnahme der $4\nu_{OH}$ Absorptionsbande charakteristisch.

Die Wasserspektren von Blättern verschiedener Kalanchoe Arten sind dem Spektrum von destilliertem Wasser auch ähnlich, obwohl da größere Unterschiede gegenüber dem Spektrum vom Kaktus beobachtet wurden (Abb.7.3.7a). Die $4v_{OH}$ Bande wurde in den Spektren der Kalanchoe Blätter kaum dargestellt aber die Intensität der Bande $3v_{OH} + v_2$ steigt etwas im Vergleich zum 2. Oberton $3v_{OH}$. Ein gleichartiges Spektrum ist auch für dicke zentrale Adern vom Tabak Blatt zu beobachten. Eine Untersuchung der Wasserspektren von feinen Blattadern ist mittels der traditionellen NIR Spektroskopie kompliziert. Solche Untersuchungen wurden mit Hilfe der bildgebenden Spektroskopie unter der Verwendung der CCD Kameras und der Bandpaßfilter durchgeführt.

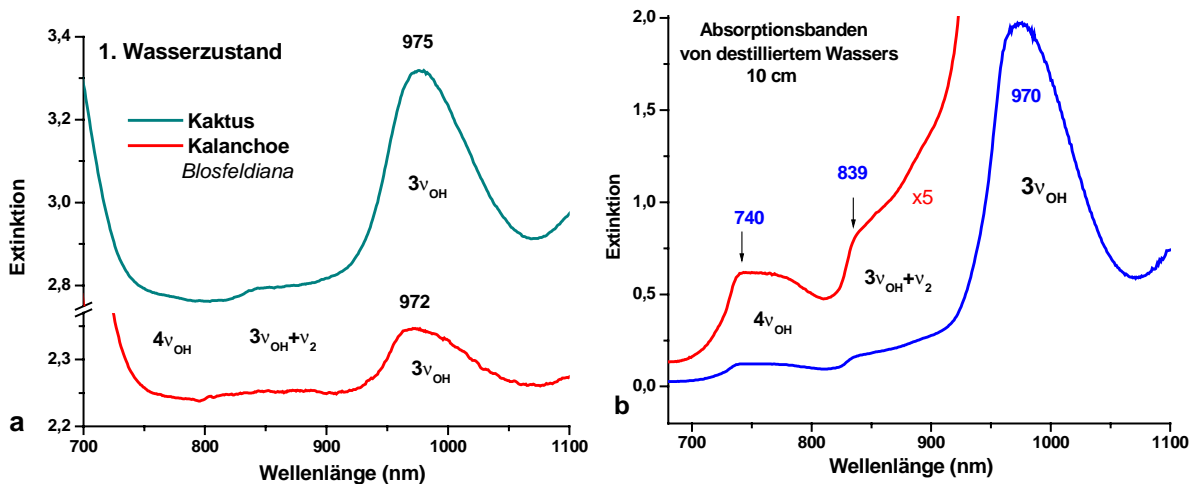


Abb.7.3.7: Erster Blattwasserzustand: Extinktionsspektren von Kaktus und Kalanchoe Blatt (a) sowie von destilliertem Wasser(b) im Bereich des $3v_{OH}$ Obertones.

Das Dominieren der mit dem destillierten Wasser gleichen Gesetzmäßigkeiten in der Anordnung der Spektralbanden ist für diesen EWZ der Pflanzenblätter charakteristisch, der als "erster Zustand des Blattwassers" bezeichnet wurde. Aber es treten doch auch einige Unterschiede auf. Wie es bereits erwähnt wurde, hat der 2. Oberton $3v_{OH}$ vom Blattwasser eine höhere Intensität im Vergleich zu $3v_{OH} + v_2$ und $4v_{OH}$ Banden als es im Spektrum von destilliertem Wasser gemessen wurde.

Kollektive und ungeordnete Wasserzustände

Dritter Wasserzustand

In den Blättern verschiedener Pflanzen wurde ein Vorhandensein des kollektiven Wasserzustandes mit der reduzierten Absorptionsfähigkeit entdeckt. Dies wurde für die starke Bande des $2v_{OH}$ Obertones bei 1460 nm beobachtet. Besonders deutlich ist diese Erscheinung für die Adern der Tabak und Kalanchoe Blätter. Der gemessene Absorptionswert für 5-7 mm dicke Hauptader vom Tabak Feldblatt ist niedriger als für die feinen Seitenadern, wie es in Abb.7.3.8a erkennen kann. Gleichzeitig wurde der maximale Absorptionswert für die Hauptader von demselben Tabak Blatt für die $2v_{OH} + v_2$ Bande bei 1200 nm beobachtet (Abb.7.3.8b). Der Aufhellungseffekt von den mit dem Wasser saturierten zentralen, seitlichen und kleinen Adern kann mittels des Bildes des Absorptionsverhältnisses der Banden bei 1460 und 1200 nm ersichtlich dargestellt werden, was in Abb.7.3.8c gezeigt wird. Dieses Bild ist ein Ergebnis vom Dividieren der Bilder bei 1460 und 1200 nm (Abb.7.3.8a,b). Die Quotientswerte dieser Absorptionsbanden für die Adern und für das Blattgewebe unterscheiden sich stark. Für das Blattgewebe beträgt es 14-30 und für die Adern - 5-13. Für destilliertes Wasser ist diesen Quotient ca. 43 gleich und hängt von der Dicke der Wasserschicht nicht ab. Damit hat das Verhältnis dieser Banden keinen Zusammenhang mit dem verschiedenen

Wassergehalt in den Adern und im Blattgewebe. Eine starke Verminderung der Quotienzwerte der Banden bei 1460 und 1200 nm weist auf eine Veränderung des Wasserzustandes hin. Die Intensitätsenkung der Banden der n_{vOH} Obertöne geschieht infolge einer Reduzierung der Anharmonizität und einer Energiesteigerung der Wasserstoffbrücken. Dadurch ist der Wasserzustand in den ungeteilten Blattadern im Vergleich zu dem EWZ im Blattgewebe stärker gebunden.

Wasserzustände eines Tabakblattes

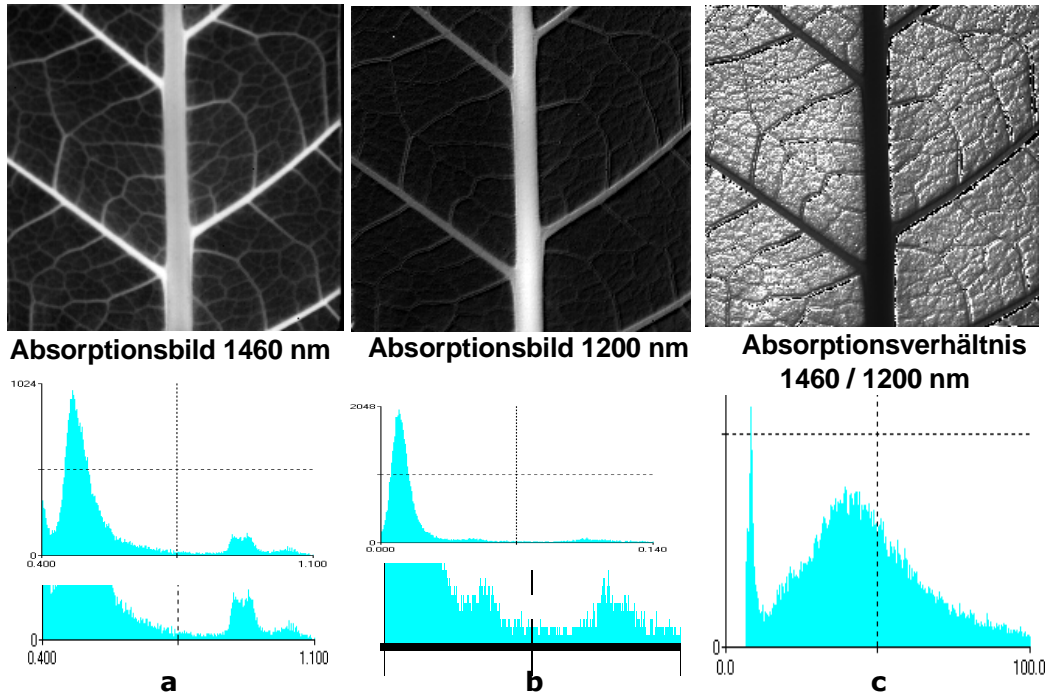


Abb.7.3.8 Absorptionbilder vom Tabak Feldblatt im Bereich bei 1460(a) und 1200 nm(b) und Verhältnis dieser Bilder(c). Entsprechende Densitogramme sind neben den Bildern gezeigt.

Ähnlich dem Eis wurde eine Rotverschiebung der Bande des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones von 970 bis zu 1040-1090 nm für einen dünnen Gewebefilm der Blattoberfläche und für den Schnitten des sukkulenten Blattgewebes beobachtet (Abb.7.3.9a). In Abbildung ist das Spektrum des Eises auch gezeigt. Den stark gebundenen Molekülen in der Eisstruktur entspricht die Bande des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones bei 1025 nm. Der eisartige EWZ wurde auch im Gewebe der jungen Rizinus Blätter gemessen. Dabei verschob sich das Maximum der Bande $3\nu_{\text{OH}}$ bis zu 1000 nm. Solche Rotverschiebungen können dem stark gebundenen Wasser in hydratischen Hüllen der Struktur von Makromolekülen entsprechen. Die Zustände von stark gebundenem Wasser (kollektiver, eisartiger Zustand) können der dritten Art des EWZ zuschreiben werden.

Vierter Wasserzustand

Gleichzeitig mit den stark gebundenen EWZ sind in Pflanzenblättern auch die schwach gebundenen EWZ im Vergleich zum destillierten Wasser vorhanden. In den Blattsäften und in den Schnitten der Hauptadern (in Aderstückchen) überwiegt der vierte Wasserzustand, für den die vier Absorptionsbanden bei 720, 795, 880 und 970 nm mit der vergleichbaren Intensität gemessen wurden (Abb.7.3.9b). Das Intensitätsverhalten und die Blauverschiebung des Maximums der Bande $3\nu_{\text{OH}}$ bis zu 968 nm weist auf eine Abschwächung (Lockerung) des Wasserstoffbrücken-Netzes hin. Dieser Zustand wurde anscheinend durch eine Dispersionsstruktur (Dispersionsphase) des Blattwassers bedingt. Der Dispersionswasserzustand wurde auch für die Spektren des Wassers im porösen Glas und in feinen (bis 40-50 μm) Wasserschichten beobachtet. Es ist äußerlich interessant,

daß dieser dritte Dispersionswasserzustand in den Spektren des Blattsaftes bei der Messungen in den 1-5 mm dicken Küvetten registriert wurde. Dies spricht für eine Erhaltung des Dispersionszustandes von solchem Wasser in großen Volumina.

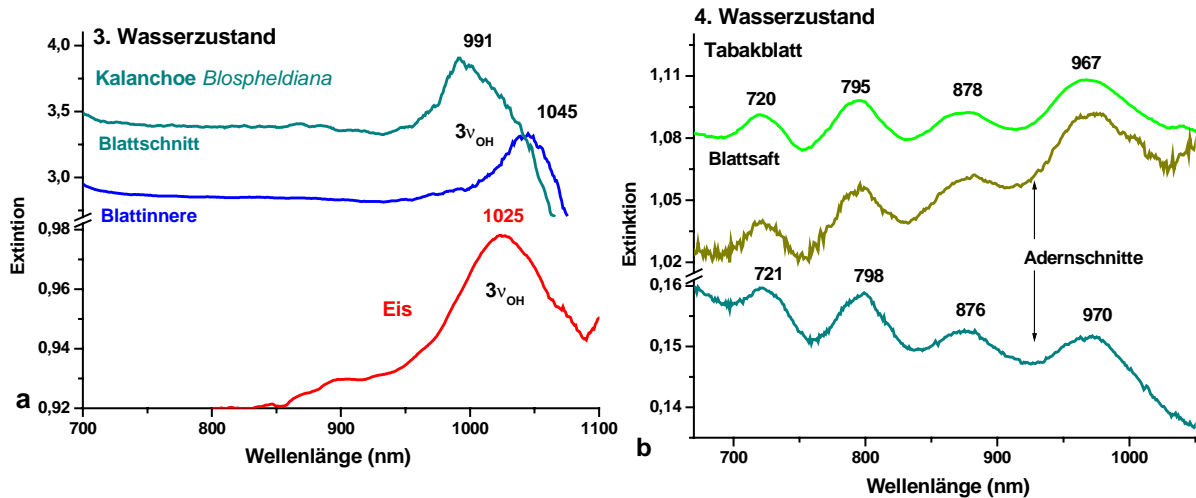


Abb. 7.3.9: Dritter(a) und vierter(b) Wasserzustand: Extinktionsspektren von Kalanchoe Blatt und Eis(a) sowie vom Saft und von Schnitten der Hauptadern eines Tabak Blattes(b).

In der Nacht verändert sich das Blattwasser von mesophyten Blättern dabei verschiebt sich das Maximum des zweiten $3V_{OH}$ Obertones bis zu 910 nm (Abb.7.3.10). Für sukkulente Pflanzen wurde in der Nacht eine schwache Blauverschiebung der Bande des $3V_{OH}$ Obertones registriert, dabei verschiebt sich diese Absorptionsbande bis zu 967 nm. Die Blauverschiebung der Bandenmaxima weist auf einen schwach gebundenen 5. Zustand hin. Die 4. und 5. Zustände mit reduzierter Energie der Wasserstoffbrücken können im Gegensatz zu den kollektiven EWZ als *ungeordnete* Wasserzustände bezeichnet werden.

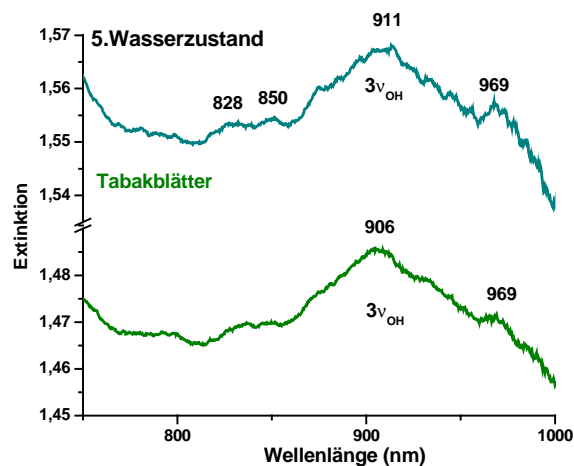


Abb. 7.3.10: Blauverschiebungen des Maximums der $3V_{OH}$ Bande für Wasser aus der Nachtphase eines Tabak Blattes (5. Wasserzustand).

Das Miniaturspektrometer ermöglichte die verschiedenen EWZ in den Blatteilen *in vivo* zu untersuchen. Dabei erlaubt die hohe Sensibilität des Miniaturspektrometers die Transmissionsspektren bei niedriger Beleuchtungsintensität zu messen. Eine wichtige Besonderheit der Wasserbanden der Nachtphase ist die große Breite und ein sichbaren Formunterschied gegenüber der Bandenform von destilliertem Wasser. Im Spektrum der Adern erkennt man eine langwellige Schulter bei 969 nm, die nah zu der Position dieser Banden für destilliertes Wasser (971 nm), liegt

Reflexionsspektren

Die verschiedenen EWZ in den Pflanzenblättern wurden auch mit Hilfe der Reflexionsspektren bestätigt, die mittels des Miniaturspektrometers registriert wurden. Die allgemeine Form der Reflexionsspektren der Blätter verschiedener Pflanzen ist in Abb.7.3.11 gezeigt. Die Reflexionsspektren des Bereiches des 2. Wasserobertones sind in Abb.7.3.12 gesondert dargestellt. Die Analyse der Reflexionsspektren ist im Vergleich zur Analyse der Absorptionsspektren schwieriger. Dies ist durch eine Abhängigkeit der Reflexionsspektren von realen und imaginären Teilen des komplexen Brechungsindex bedingt. Aber es zeigte sich für die breiten Absorptionsbanden von Wasser und Chlorophyll, daß die Reflexionsspektren der untersuchten Blätter den Transmissionsspektren ähnlich sind. Damit wurde ihre Interpretation vereinfacht.

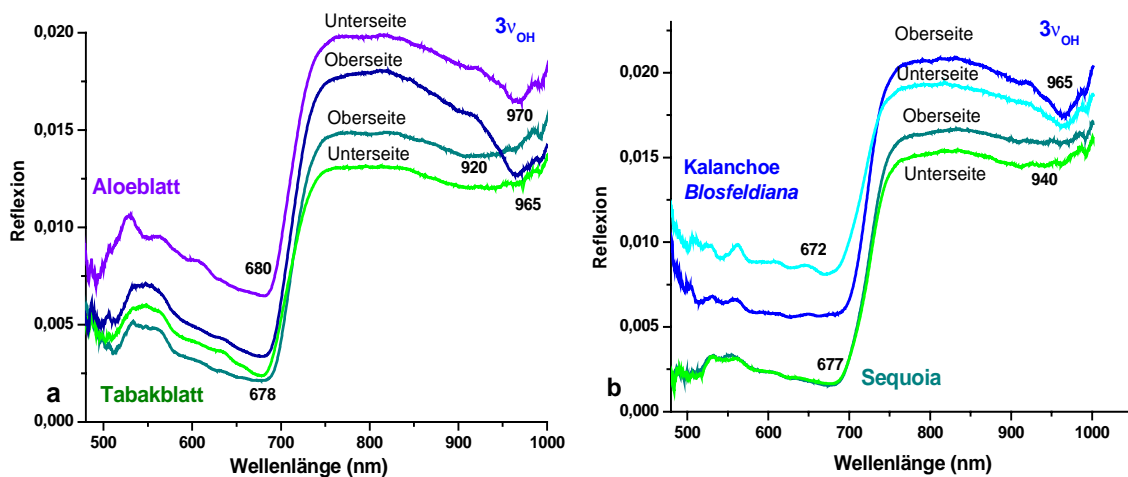


Abb.7.3.11: Reflexionsspektren von Ober- und Unterseiten eines Aloe und Tabak Blattes (a) sowie eines Kalanchoe Blattes und Nadeln des Mammutbaums (*Sequoia gigantea*) (b).

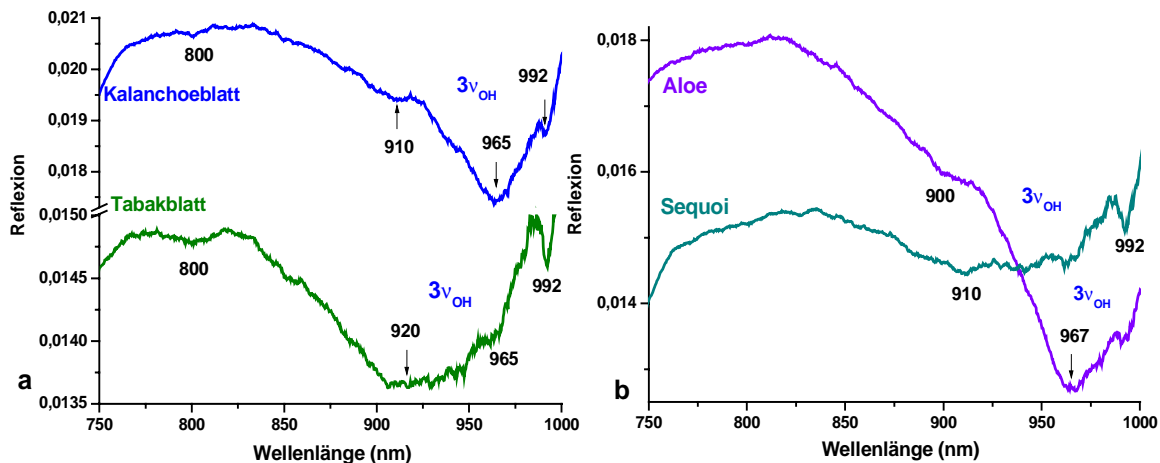


Abb.7.3.12: Reflexionsspektren im Bereich der 3v_{OH} Wasserbande eines Tabak und Kalanchoe Blattes (a) sowie für Aloe und Nadeln des Mammutbaums (*Sequoia gigantea*) (b).

Die Reflexionsspektren ermöglichen die Unterschiede in den Spektren von Ober- und Unterseite vom Blatt zu registrieren. Die Chlorophyllbanden im Reflexionsspektrum der Oberseite von Tabak Blatt sind intensiver und breiter als diese der Unterseite. Dies wird durch einen größeren Chlorophyllgehalt an Oberseite des Tabak Blattes bedingt. Ein ähnliches Verhalten der Chlorophyllbanden wurde auch für die Kalanchoe und Aloe Blätter beobachtet. In Reflexionsspektren von unterer Blattseite wurde eine Steigerung des MLS-Niveaus im Bereich der Wasserbanden registriert.

In den untersuchten Reflexionsspektren traten wenigstens drei EWZ auf. In den Reflexionsspektren der sukkulenten Kalanchoe und Aloe Blätter dominierten die Banden 960-970 nm (1. EWZ), wie es auch in den Transmissionsspektren beobachtet wurde. Das biologisch aktive Wasser (2. Zustand) mit dem Maximum bei 910-920 nm wurde in den Tabak Blättern und Sequoia Nadeln (Mammutbaum, *Sequoia gigantea*) gemessen. Diese Blätter besitzen auch das Wasser im 1. Zustand, der sich als eine schwache Schulter im Spektralbereich 960-970 nm zeigt. Das Wasser des 2. Zustandes wurde in kleinen Mengen in den sukkulenten Pflanzen vorhanden, worauf die schwachen Schultern im Spektralbereich bei 900-910 nm hinweisen. In allen untersuchten Reflexionsspektren sind auch die engen Absorptionsbanden bei 992 nm des strukturierten Wassers sichtbar, das anscheinend zu den Hydrathüllen der Struktur der Makromoleküle gehört.

Spektrale Modellierung der Wasserzustände

Verschiedene EWZ der Pflanzenblätter wurden bei einer Veränderung des Volumens und des Dispersionsgrades von Wasserproben sowie bei einer Auflösung verschiedener Stoffe (Salze, Alkalis, Säuren, Zellulose, Fructose und Gelatine) in destilliertem Wasser modelliert. Damit wurde die wichtige Rolle der geometrischen Faktoren für die Änderung der EWZ gezeigt. Dabei wurde in einer 400 μm dicken Wasserschicht der 1. Zustand mit einer maximalen Intensität der Bande 970 nm registriert. Als die Wasserschichtdicke auf 45 μm reduziert wurde, wurde der 4. Zustand mit den Absorptionsbanden bei 720, 790, 870 und 970 nm der etwa gleichen Intensität registriert. Der 4. Zustand von Dispersionswasser wurde auch in einem Porösglas und in saturierten Lösungen CuSO_4 , Cs_2SO_4 und KI beobachtet. Der 2. Wasserzustand, der durch eine Zunahme der Bande 850 nm charakterisiert wird, wurde auch in den Spektren der winzigen Wassertröpfchen auf einer Glasplatte gemessen und damit modelliert. Der dem 2. Wasserzustand ähnliche Zustand wurde in saturierten Lösungen der Zellulose realisiert.

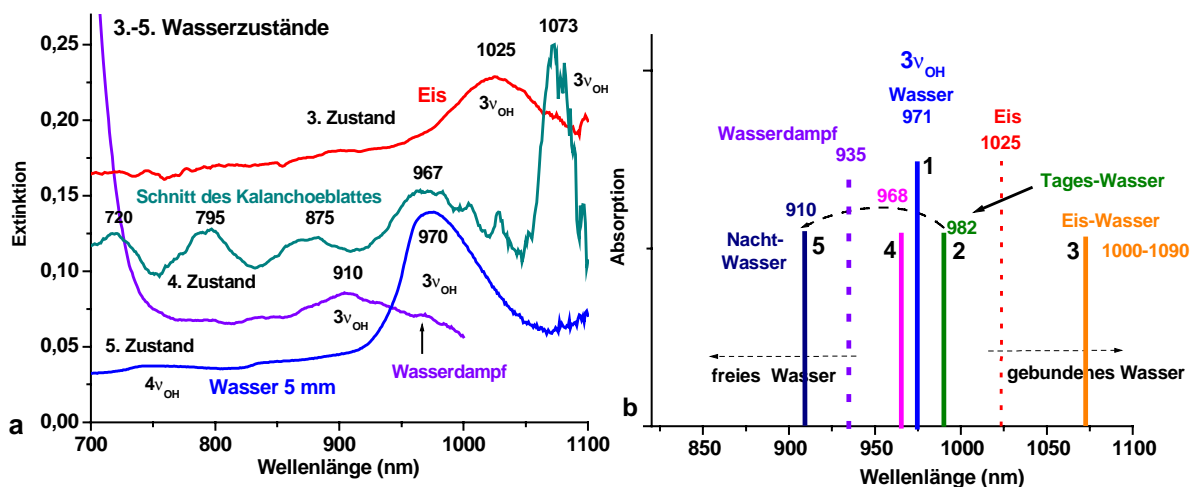
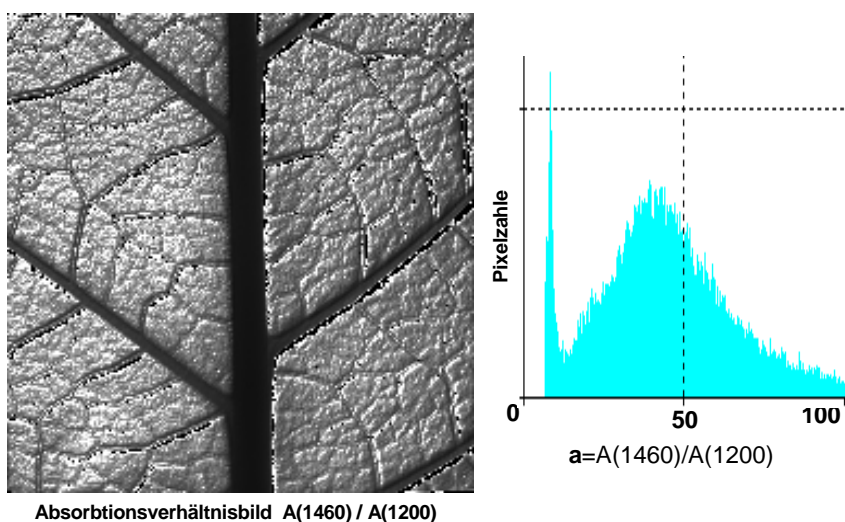


Abb. 7.3.13: Die Veränderungen der Frequenzen der $3\nu_{\text{OH}}$ Wassermode in Extinktionsspektren der verschiedenen EWZ (a). Vergleich der Lagen von $3\nu_{\text{OH}}$ Bandenmaxima der verschiedenen Zustände von Blattwasser, Wasserdampf, flüssigem Wasser und vom Eis (b).

Die starke Frequenz-Änderungen der Bandenmaxima des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones für den verschiedenen EWZ sind in Überblickweise in Abb. 7.3.13 präsentiert. Die Lage der $3\nu_{\text{OH}}$ Absorptionsbanden von destilliertem Wasser, von Wasserdampf und Eis sind in Abbildung ebenfalls gezeigt. Den Vergleich der Absorptionsmaxima zeigt, daß die Pflanzenblätter das Wasser in einigen sowohl stark gebundenen (kollektiven) als auch in schwach gebundenen Zuständen bezüglich dem destillierten Wasser erhalten. In physiologisch aktiven jungen Blättern wurde der stark gebundenen EWZ mit einer Rotverschiebung der $3\nu_{\text{OH}}$ Bande und gleichzeitig eine Intensitätszunahme der $3\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ Bande beobachtet. In den alten Blättern sinkt die Intensität der Bande bei 850 nm. Die oben geschriebene Analyse der Spektralbanden von Pflanzenblättern ermöglicht die verschiedene Blattwasserzustände unterscheiden.

7.3.2. Visualisierung und Analyse der Wasserzustände

Im Vergleich zur Standardspektroskopie bietet bildgebende Spektroskopie mehr Möglichkeiten für die Beobachtung und Analyse verschiedener EWZ. Dabei kann die Verteilung der verschiedenen EWZ in den Blattgeweben und Adern registriert werden. Wie schon oben gezeigt wurde, besonders vorteilhaft ist die Anwendung von Spektralbildern des Absorptionsverhältnisses von Schwingungsbanden der Obertöne ν_{OH} und der Kombinationstöne $\nu_{\text{OH}} + \nu_2$. In Abb.7.3.14 ist das Bild der Absorptionsverhältnisse der Banden bei 1460 und 1200 nm von einem Tabak Feldblatt gezeigt. Für dieses Bild ist eine starke Inhomogenität typisch. Das Verhältnis $\alpha = A(1460)/A(1200)$ ändert sich in einem großen Intervall ($0 < \alpha < 100$). In Blattadern aufgrund des Aufhellungseffektes sinkt die Wasserabsorption der Bande bei 1460 nm sehr stark und im Bild der Verhältnisse sehen die Adern dunkel aus. Für die Rizinus Blätter ist die Situation ähnlich.



Absorptionsverhältnisbild $A(1460)/A(1200)$

Abb.7.3.14: Spektralbild des Absorptionsverhältnisses $A(1460)/A(1200)$ eines Tabak Feldblattes und das entsprechende Densitogramm.

In Abb.7.3.15 ist das Bild des Absorptionsverhältnisses bei 1460 und 1200 nm vom Rizinus Blatt und das entsprechende Densitogramm gezeigt. Hier sehen die Adern ebenfalls dunkel aus. Dies weist darauf hin, daß die Absorptionsbande des $2\nu_{\text{OH}}$ Obertones (1460 nm) im Vergleich zu der $2\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ Bande (1200 nm) reduziert, was eine Folge der Verminderung von Anharmonizität bei der Verstärkung von Wasserstoffbrücken ist und was dem stark gebundenem EWZ entspricht. Es ist zu betonen, daß diese Inhomogenität der Verhältnisbilder nicht mit der Inhomogenität der Blattbeleuchtung oder der Apparateffekte zu tun hat. Die Inhomogenität der Beleuchtung ist wegen der Benutzung der Ausgangsbilder der Transmission nicht von Bedeutung.

Für die Bestätigung dieser Tatsache wurde das Verhältnis der Transmissionsbilder 1200/1100 nm bestimmt. Das Densitogramm dieses Verhältnisbildes hat die wesentlich kleinere Breite im Vergleich zum 1460/1200 nm Verhältnis (Abb.7.3.16). Wenn sich die gesamte Wassermenge in den Pflanzenblättern im gleichem Zustand befinden würde, so sollte es ein homogenes Feld im Verhältnisbild von zwei Absorptionsbanden ergeben. Folglich ist ein großer Bereich der α -Werte durch ein breites Spektrum der Wassereigenschaften in den Pflanzenblättern bedingt.

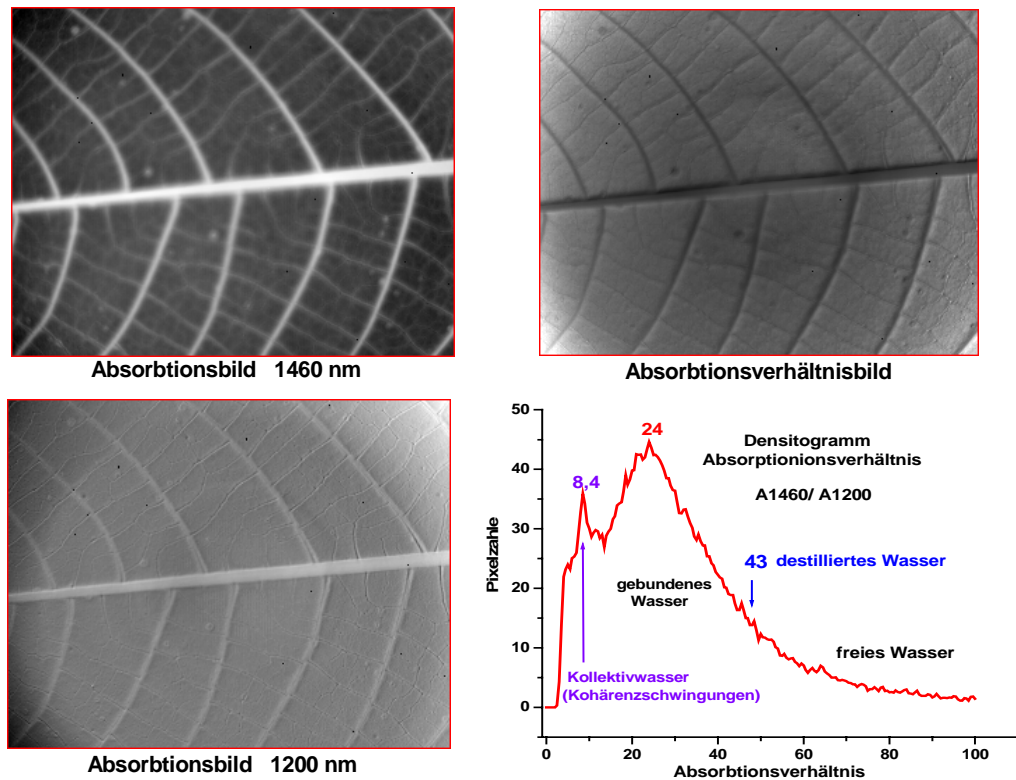


Abb. 7.3.15: Absorptionenbilder eines *Rizinus* Blattes bei 1460 und 1200 nm und ein Verhältnissbild A1460/A1200 nm sowie ein Densitogramm dieses Verhältnisses.

Eine Methode zur Bestimmung des quantitativen Gehaltes jedes der vier Wasserzustände in Pflanzenblättern wurde entwickelt und geprüft. Diese Methode basiert auf einer Dekonvolution des Densitogramms vom Verhältnis der Absorptionsbanden bei 1460 und 1200 nm in den Gauß-Komponenten. Die Dekonvolution eines typischen Densitogramms vom Verhältnissbild der Banden 1460/1200 nm in den Gauß-Komponenten für das Tabak Blatt ist in Abb.7.3.17 dargestellt. Die Parameter der Dekonvolution sind in Tab.7.3.1 angegeben.

Ein Maximum bei $a=13$ entspricht dem kollektiven Wasserzustand mit der reduzierten Absorption in Blattadern. Eine asymmetrische breite Bande mit dem Maximum bei $a=30$ läßt sich mindestens in drei Gauß-Kurven zerlegen. Sie entsprechen dem 1., 2. Wasserzustand und dem "freien" Wasser. Die Lage der Gauß-Kurve des 1. Wasserzustandes bei $a=46,7$ ist sehr nah zum Verhältnis $a_0=43$ von destilliertem Wasser. Für den 2. Zustand ist $a=31$ und für das freie Wasser $a=78,8$. Aus den relativen Flächen der Gauß-Kurven kann der Prozentsatz verschiedener EWZ in den Blättern bestimmt werden (Tab. 7.3.1).

Es stellte sich heraus, daß das Wasser im Blattgewebe von Tabak zu 30% im 1. Zustand, ungefähr zu 40% im 2. Zustand und ungefähr zu 20% aus schwach gebundenem ("freiem") Wasser besteht. Das kollektive Wasser der Adern bedeckt ca. 7% der Blattfläche. Das Wasser im 2. und besonders im 3. Zustand ist stärker gebunden als das Wasser im 1. Zustand. Die Analyse hat gezeigt, daß es in den jungen *Rizinus* Blättern mehr gebundenes Wasser gibt als in den alten Blättern. Das Maximum des gebundenen Wassers im 2. Zustand liegt für das junge *Rizinus* Blatt bei $a=16$ und für reifen und alten Blättern bei $a=24$. Im Tabak Blatt ist das Wasser insgesamt weniger gebunden im Vergleich zum *Rizinus* Blatt. Das stark gebundene Wasser befindet sich anscheinend in

Chloroplasten und in anderen Organellen sowie im Transportsystem der Adern. Das freie Wasser könnte sich im Zytoplasma und in der Vakuole konzentrieren.

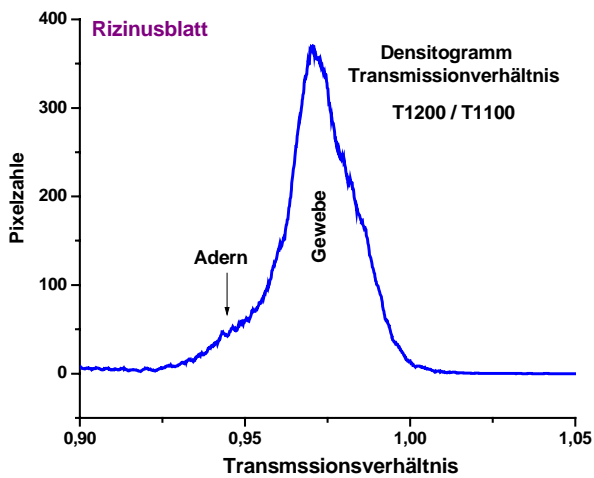


Abb.7.3.16: Densitogramm vom Verhältnisbild der Transmission bei 1200 und 1100 nm eines Rizinusblattes

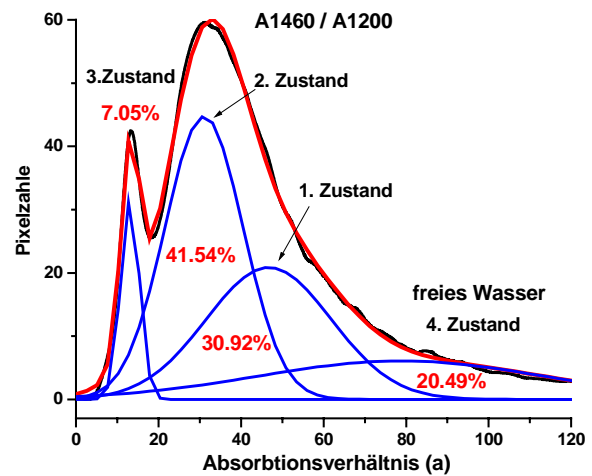


Abb.7.3.17: Zerlegung des Densitogramms vom Verhältnis A 1460/A 1200 nm in den Gauß-Komponenten für ein Tabak Feldblatt.

Peak	Center	Height	Width	Area	Quantität
1	13.10	31.48	4.58	180.77	7.05%
2	31.01	44.76	19.00	1065.3	41.54%
3	46.70	20.86	30.34	793.21	30.92%
4	78.73	6.08	68.96	525.43	20.49%

Tab. 7.3.1: Die Parameter der Dekonvolution des Densitogramms vom Verhältnisbild der Absorptionsbanden bei 1460 und 1200 nm in den Gauß-Komponenten für ein Tabak Feldblatt.

7.3.3. Zeitliche Dynamik der Wasserzustände in Blättern

Die zeitliche Dynamik der EWZ in den Blättern wurde erstmalig untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß sich der Grad der "Gebundenheit" des Wassers abhängig von der Tageszeit ändert. Am Tage dominiert im Blattgewebe gebundenes Wasser und in der Nacht schwach gebundenes Wasser. Um die Transformationen der EWZ bei physiologischen Prozessen zu untersuchen, wurde ein spezielles *in vitro* Experiment durchgeführt. Dafür wurde ein Tabak Feldblatt in destilliertes Wasser gestellt und eine Sequenz der Spektralbilder im Laufe 1,5 Stunden aufgenommen. Während dieser Zeit hat der Wassergehalt im Blatt auf 8,8% eingesaugt. Eine Veränderung der EWZ im Blatt wurde mittels der Methode der Verhältnisse der Absorptionsbanden 1460 und 1200 nm analysiert.

Es wurde die Reproduzierbarkeit der Zerlegungen bei Variationen der Ausgangsbedingungen untersucht. Die größten Abweichungen in der Bestimmung der Lage von Komponenten waren kleiner als 3%. Wegen einer größeren Abweichung der Zerlegungen in den Komponenten der 1. und 2. Zustände wurde im weiteren ihr gemeinsamer Betrag betrachtet. Die zeitliche Dynamik der EWZ im Blatt ist in Abb.7.3.18 dargestellt. Wie zu sehen ist, steigt die Menge von kollektivem Wasser des 3. Zustandes und von Wasser des 1. und 2. Zustandes zuerst an (rote Kurve). Gleichzeitig verringert sich die Menge

des freien Wassers im Blattgewebe. Im Folgenden wandelt sich das gebundene Wasser des 1., 2. und 4. Zustandes in das freie Wasser um (grüne Kurve).

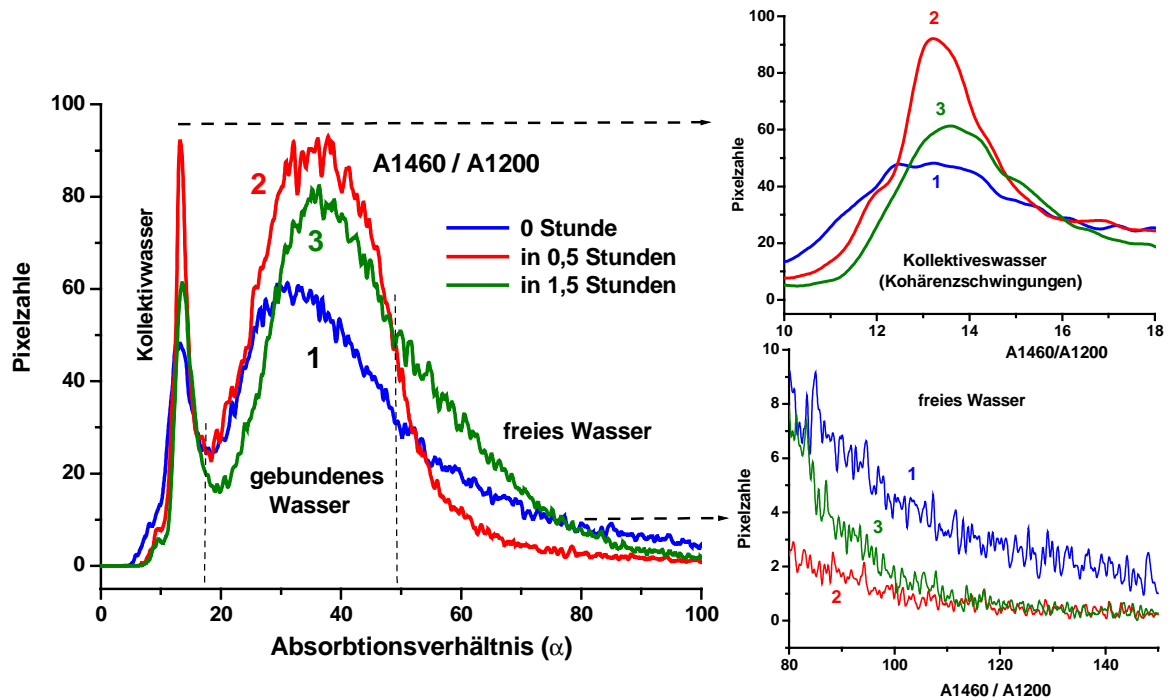


Abb. 7.3.18: Dynamik der Veränderung der Densitogramme und der verschiedenen EWZ vom Tabak Feldblatt bei der gesamten Wassersaugung (8,8%). Veränderung des Gehaltes von kollektivem und freiem Wasser (rechts).

Zur Analyse der Transformationsprozesse von EWZ im Tabak Blatt wurde eine Dekonvolution entsprechender Densitogramme in den Gaus-komponenten durchgeführt. Dabei wurde nach dem Prozentsatz jedes der EWZ gesucht. Die Ergebnisse dieser Dekonvolution sind in Abb.7.3.19 und in der Tabellen 7.3.2 und 7.3.3 zu sehen. Eine Reihe der nacheinanderfolgenden Densitogramme von Bildern des Absorptionsverhältnisses ist in Abb.7.3.19 gezeigt. Nach einer halben Stunde ist die Menge des kollektiven Wassers in Blattadern stark gestiegen. Dieses Wasser hat eine niedrige Absorption. Gleichzeitig hat die Menge von gebundenem Wasser des 2. Zustandes im Blattgewebe zugenommen und die Menge von freiem Wasser mit hohen α -Werten reduziert. Im Folgenden während einer Stunde hat sich das gebundene Wasser in freies umgewandelt.

Peak	Center	Height	Width	Area
1	13.49	59.68	3.07	229.78
2	33.10	77.52	18.16	1764.5
3	44.74	28.26	11.82	418.61
4	50.21	8.85	38.06	422.16

Tabl. 7.3.2: Parameter der Dekonvolution des Densitogramms vom Verhältnisbild A1460/A1200 in 0,5 Stunden nach dem Beginn der Wassersaugung für Tabak Feldblatt (Abb. 7.3.19b).

Peak	Center	Height	Width	Area
1	13.95	48.87	3.26	199.49
2	42.00	22.00	22.90	631.21
3	34.55	39.85	13.68	683.23
4	49.60	28.67	37.40	1344.0

Tabl. 7.3.2: Parameter der Dekonvolution des Densitogramms vom Verhältnisbild A1460/A1200 in 1,5 Stunden nach dem Beginn der Wassersaugung für Tabak Feldblatt (Abb. 7.3.19c).

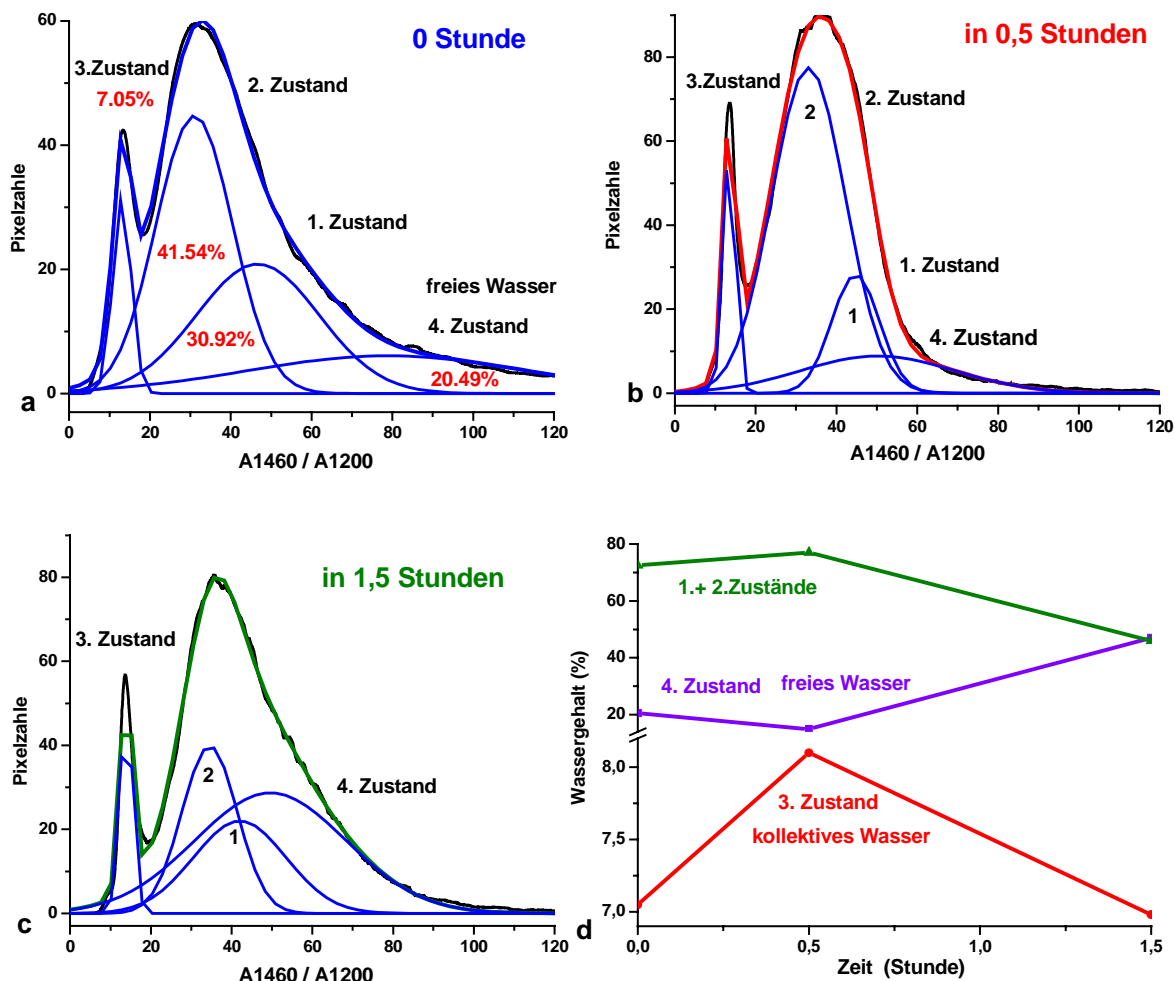


Abb. 7.3.19: Dekonvolution der Densitogramme des Absorptionsverhältnisses 1460/1200 nm für Ausgangsblatt(a), in 0,5 Stunde(b) und in 1,5 Stunden(c) der Wassersaugung vom Tabak Blatt. Zeitliche Dynamik der quantitativen EWZ-Änderung im Tabak Blatt (d)

7.3.4. Raumspektren von Wasser der Pflanzenblätter

Die Raumspektren der Absorptionsspektren für das Blattgewebe und die Adern vom reifen und jungen Rizinus Blatt sind für den Bereich des $2\nu_{OH}$ Wasserbandes in Abb. 7.3.20 gezeigt. Diese Spektren wurden mittels der DSA-Methode nach der Höhe der Densitogramm-Maxima, das heißt nach der Anzahl der Bildpixel von den gleichen Absorptionswerten ermittelt. Solche Spektren zeigen die statistische Charakteristik der räumlichen Verteilung und die Menge von Bildpixel der gleichen Grauwerte, das heißt im Fall der Spektralbilder - die räumliche Verteilung der Absorptions-, Transmissionswerte oder Werte der Wasserdichte über Blattfläche. Die Raumspektren charakterisieren die räumliche Homogenität der Absorptionswerte für das Blattgewebe und für die Adern im Spektralbereich der Wasserabsorption.

Die Raumspektren sind empfindlicher bezüglich einer Veränderung des Wasserzustandes im Vergleich zu den gewöhnlichen Absorptionsspektren. Während der $2\nu_{OH}$ Wasserbanden der gewöhnlichen Spektren für Gewebe und Adern einander sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich in den Raumspektren wesentlich voneinander, was durch den Unterschied in ihren Wasserzuständen erklärt werden kann. Für die Adern liegt das Maximum des Raumspektrums bei 1420-1460 nm, und für das Gewebe bei 1460-1500

nm. Außerdem sind die Wasserbanden für das Blattgewebe in dem langwelligen Bereich und für die Adern in dem kurzwelligen Bereich asymmetrisch.

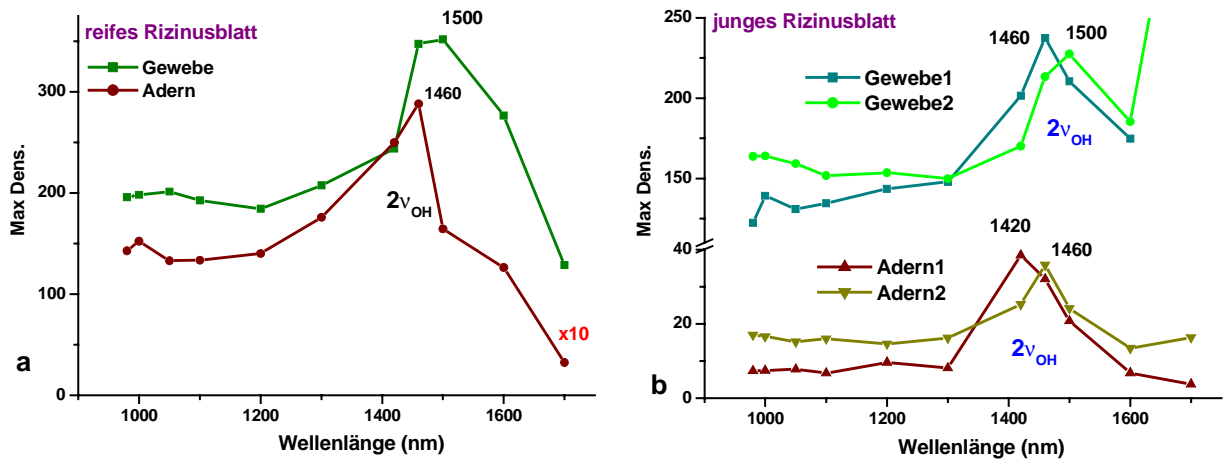


Abb. 7.3.20: Raumspektren des Wassers in Gewebe und Adern von reifen (a) und jungen (b) Rizinus Blättern.

Die Raumspektren für verschiedene Teile des Tabak Blattes und auch für das Gewebe nach der Wasserinfiltration sind in Abb.7.3.21 dargestellt. Das Raumspektrum des wasserinfiltrierten Tabakgewebes unterscheidet sich wesentlich vom Raumspektrum des nichtinfiltrierten Blattes. Für das wasserinfiltrierten Gewebe wurde im Bereich der Absorptionsbande des $2\nu_{OH}$ Obertones ein Minimum und im Bereich 1000-1200 nm ein Maximum beobachtet.

Es könnte durch zunehmender Inhomogenität des Blattgewebes im Bereich der $2\nu_{OH}$ Absorptionsbande und zwischen den Banden der Obertöne $2\nu_{OH}$ und $3\nu_{OH}$ bei der Wasserinfiltration bedingt werden. Wahrscheinlich hängt die Inhomogenität des Blattgewebes im Bereich der Absorptionsbande nur teilweise mit dem Wasserinfiltrationsgrad zusammen. Sie kann auch durch den Unterschied der EWZ von eigenem Blattwasser und dem Wasser, das bei der Wasserinfiltration eingesaugt wurde, verursacht werden.

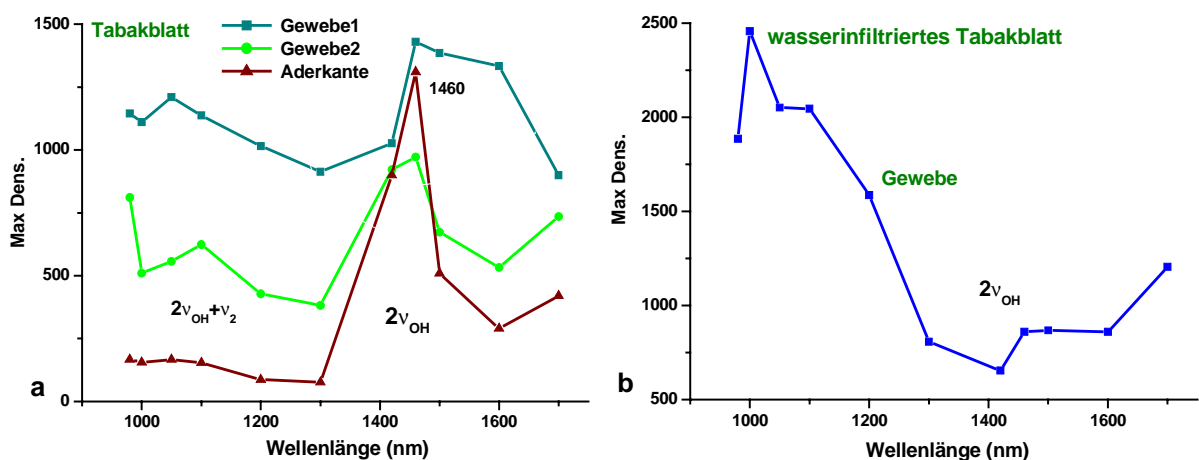


Abb. 7.3.21: Raumspektren des Wassers für Gewebe und Adern von nichtinfiltrierten (a) und wasserinfiltrierten (b) Tabak Blättern.

Fazit

Verschiedene Wasserzustände in Pflanzenblättern wurden entdeckt, dafür wurden das Verhalten der Banden $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ und $3\nu_{\text{OH}}$ (850 und 970 nm) analysiert. Diese höheren Schwingungsmoden könnten als ein spektraler "Detektor" der Wasserzustände von Pflanzenblättern dienen. Kriterien für eine Identifizierung der EWZ in Pflanzenblättern festgestellt.

Die spektralen Eigenschaften des 1. Wasserzustandes sind denen des destillierten Wassers ähnlich. Für den 1. Zustand ist die Intensität der Bande des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones größer als die der benachbarten $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ bzw. $4\nu_{\text{OH}}$ Wasserbanden.

Für den 2. Wasserzustand in den Blättern ist eine Intensitätszunahme des $3\nu_{\text{OH}}+\nu_2$ Kombinationstones bei 850 nm charakteristisch. Der Absorptionsgrad dieser Bande erreicht Werte bis um das 1000fache größer als die Intensität des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones. Der 2. Wasserzustand ist für das Gewebe der mesophyten Blätter charakteristisch und ist vermutlich mit der Photosynthese verbunden.

Für den 3. Wasserzustand wurde eine Rotverschiebung der Bande des $3\nu_{\text{OH}}$ Obertones von 970 bis zu hin 1090 nm gemessen. Dies entspricht einer Verstärkung des Wasserstoffbrücken-Netztes im Wasser, das sich ebenso im Eiszustand äußert.

Im 4. Wasserzustand (Dispersionswasser) werden vier Absorptionsbanden bei 720, 795, 880 und 970 nm der gleichen Intensität beobachtet. Bei einer spektralen Modellierung hat sich erwiesen, daß das ähnliche Verhalten der Absorptionsbanden für Wasser in einem Porösmedium (Porösglas) charakteristisch ist.

Die Wasserzustände wurden in Pflanzenblättern der verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Es wurde der Anteil der verschiedenen Wasserzustände in den Blättern mit Hilfe der Analyse der Verhältnisse der Absorptionsbanden $\alpha=A(1460)/A(1200)$ durchgeführt. Eine Transformation wurde der Wasserzustände in den Pflanzen bei physiologischen Prozessen festgestellt.

Zum ersten Mal wurden Raumspektren für Wasser in Pflanzenblättern ausgewertet. Raumspektren sind empfindlicher bezüglich der Änderung des Wasserzustandes im Vergleich zu den konventionellen Absorptionsspektren.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden innovative Methoden der bildgebenden Spektroskopie für die Ermittlung und Bearbeitung von spektralen Bildsequenzen entwickelt. Insbesondere wurden Verfahren für die Bestimmung der korrekten (zuverlässigen) Absorptionsspektren von inhomogenen, stark streuenden Objekten wie ein Pflanzenblatt, erarbeitet. Mit Hilfe der aufgebauten bildgebenden CCD-Spektrometer und entwickelten Bildverarbeitungsmethoden wurden spektrale Eigenschaften von Wasser und Chlorophyll in Pflanzenblättern untersucht. Dabei wurde räumliche Chlorophyll- und Wasser-Verteilung in den Pflanzenblättern zum ersten Mal ermittelt und analysiert. Damit wurde neue spektrale Methode für die Bestimmung des Blattwassergehaltes entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Die spektrale Gesetzmäßigkeiten der höchsten Schwingungsmoden von Wasser wurden untersucht und dabei verschiedene energetische Blattwasserzustände wurden entdeckt. Eine innovative Methode, die Densitogramm-Spektral-Analyse, wurde für die Bearbeitung der spektralen Bildsequenzen entwickelt und für Untersuchungen der spektral-optischen Eigenschaften von Pflanzenblättern angewendet.

Entwicklung von neuen Methoden

Es wurde ein Modell des orts aufgelösten CCD-Prismenspektrometers entwickelt, das die Aufnahme der Bildspektren mit einer spektralen und einer räumlichen Koordinate ermöglicht. Eine über das Objekt gescannte Sequenz der Bildspektren liefert räumliche Verteilung der Spektralcharakteristiken von ganzem Objekt. Die Kompaktheit und einfache Handhabung des Prismenspektrometers wurde durch die Anwendung des Amichi Geradsichtprismas gewährleistet. Dieses ermöglichte auch einen goniometrischen Aufbau des CCD-Prismenspektrometers zu benutzen, um Untersuchungen der Reflexions- und Transmissionscharakteristiken von Pflanzenblättern bei verschiedenen Winkeln durchzuführen. Das Spektrometer wurde mit Hilfe der Spektrallinien von Quecksilber und Argon kalibriert.

Ein bildgebendes 32-Kanal CCD-Spektrometer wurde entwickelt, das die Aufnahme einer Sequenz von Spektralbildern der bestimmten Wellenlängen zuläßt, die durch die Interferenz-Bandpaßfilter ausgefiltert werden. Um den Einfluß der Querdiffusion der Strahlung zu vermindern, wurde die räumlich homogene Halogenbeleuchtung einer Ulbricht Kugel verwendet. Das bildgebende CCD-Spektrometer wurde für die Aufnahme von den Spektralbildern der Pflanzenblätter für die Untersuchung der räumlichen Verteilung von Chlorophyll (VIS Bereich) und Blattwasser (NIR Bereich) verwendet.

Das aufgebaute bildgebende Spektrometer hat im VIS und NIR Bereich eine um das 30-50fache bessere Sensibilität als die der besten Serienspektrometer. Dies wird durch das Addieren ähnlicher Signale über eine große Bildpixelanzahl und durch eine effektive Aufnahme der gestreuten Strahlung bedingt. Dieses bildgebende Spektrometer ist eine optimale Spektrometerart, um stark streuende Medien zu untersuchen. Die Benutzung der Kombination von Bandmaß- und Polarisationsfiltern erlaubt die Aufnahme und Analyse der Spektralbilder in polarisiertem Licht.

Die innovative Methode der Densitogramm-Spektral-Analyse (DSA) wurde entwickelt, die den Übergang von einer Analyse der Sequenzen der Spektralbilder zu der Ermittlung und Analyse ihrer Spektren ermöglicht. Mittels dieser Methode werden Signale von über das gesamte Bild verteilten Pixel mit ähnlichen Eigenschaften summiert, um die Spektren für die einzelnen strukturellen Elemente von inhomogenen und stark streuenden Objekten

zu ermitteln. DSA-Methode ermöglicht die gewöhnlichen Transmissionsspektren nach der Maximumlage und die Raumspektren nach Maximumhöhe der Densitogramm-Banden zu ermitteln. Die innovative Raumspektren beschreiben die Raumstruktur eines Objekts in Bezug auf die Homogenität seiner Spektralcharakteristiken bzw. seiner strukturellen Elemente. Unter Verwendung des multispektralen bildgebenden CCD-Spektrometers und der DSA-Methode wurden die Spektralcharakteristiken von Chlorophyll und Blattwasser ausführlich untersucht. Damit wurde gezeigt, daß die DSA-Methode bei jeder Bearbeitungsstufe der Spektralbilder erfolgreich angewendet werden kann. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung der auf verschiedene Weise erhaltenen Absorptionsspektren von Blattkomponenten festgestellt.

Für die Ermittlung der korrekten Istwerte der Absorptionsbanden unter Berücksichtigung der Wechselwirkung der Mehrfachlichtstreuung und Absorption wurde eine neue Methode des "Eintauchens" der Absorption in den MLS-Untergrund entwickelt. Die Absorptionsbanden in den Extinktionsspektren werden dabei unter Berücksichtigung der selektiven Abnahme des MLS-Niveaus im Absorptionsbereich bestimmt. Die Istwerte der korrekten Absorptionsbanden können die beobachteten Banden aufgrund ihres "Eintauchens" um ein vielfaches übersteigen. Die entwickelte Methode hat eine allgemeine Bedeutung und kann für die Analyse der Spektren von den verschiedenen inhomogenen Objekten verwendet werden.

Für die Aufbesserung der Absolutwert der Absorption wurde zusätzlich eine Methodik der Ermittlung der Verstärkungskoeffizienten der Absorptionsbanden infolge der starken MLS im Blattgewebe entwickelt. Dafür wurde ein Effekt der Reduzierung des MLS-Beitragtes in wasserinfiltrierten Blättern verwendet. Die Verstärkungskoeffizienten kann nach einem Dividieren der Absorptionsbanden von den nichtinfiltrierten und wasserinfiltrierten Blättern bestimmt werden. Die Werte der Verstärkungskoeffizienten für verschiedene Schwingungsmoden von Blattwasser liegen im Intervall von 1,25 bis 1,75 und steigen im kurzwelligen Bereich an.

Um das Spektrum der Wasserzustände zu untersuchen, wurde eine Methode der Verhältnisse der Absorptionen für die Schwingungsmoden der $n_{\text{V}_{\text{OH}}}$ Obertöne und der $n_{\text{V}_{\text{OH}}+\text{V}_2}$ Kombinationstöne vorgeschlagen. Eine Veränderung der Bandenintensität ist mit dem Verhalten des Elektronen-Subsystems verbunden und ist empfindlicher als die Frequenzen bezüglich der Veränderung des Wasserzustandes. Es wurde gezeigt, daß für verschiedene Wasserzustände spezifische Verhältnisse der Absorptionsbanden $A(1460)/A(1200)$ charakteristisch sind. Mittels einer Dekonvolution (Zerlegung) des Densitogramms der Absorptionsverhältnisbilder für die Banden 1460 und 1200 nm in Gauß-Komponenten konnte der Anteil jedes der vier Wasserzustände in den Blättern bestimmt werden.

Spektraluntersuchung der Mehrfachlichtstreuung in Blättern

Die Mehrfachlichtstreuung beeinflusst stark die optisch-spektralen Charakteristiken der Pflanzenblätter. Die Absorptionsvermögen von Chlorophyll und Blattwasser nimmt infolge der MLS das heißt infolge der Vergrößerung der effektiven Weglänge des Lichtes im Blattgewebe zu. Für die Untersuchung des MLS-Einflusses auf die Spektralcharakteristiken von Pflanzenblättern wurden die Sequenz von Transmissions-, Extinktions- und Absorptionen der Tabak und Rizinus Blätter sowie für die wasserinfiltrierten Blätter aufgenommen und analysiert. Die Beiträge der Absorption, Transmission und der MLS zu den Lichtprozessen im Blattgewebe und in den Adern wurden im Bereich der Absorptionsbanden vom Chlorophyll und Wasser bestimmt.

Für die intensivsten Banden $\nu_{OH+\nu_2}$ und $2\nu_{OH}$ von Wasser der Tabak und Rizinus Blätter, die mit einem herkömmlichen Serienspektrometer gemessen wurden, sind die Verhältnisse des MLS-Untergrundes zur Absorption einem Faktor $\eta=2-9$ gleich. Für schwächere Wasserbanden $3\nu_{OH+\nu_2}$ und $3\nu_{OH}$ bei 850 und 970 nm ist der MLS-Untergrund um das 500-1000fache größer als Absorption. Für die Spektraldaten, die mittels des aufgebauten bildgebenden CCD-Spektrometers gemessen wurden, beträgt dieser Faktor $\eta=5-20$, weil die eingesetzte CCD-Kamera eine hohe Sensibilität im Spektralbereich der untersuchten Wasserbanden hat und dabei mehr gestreute Strahlung registriert wird. Die mithilfe der bildgebenden Spektroskopie erhaltenen Daten zeigen, daß im Maximum der intensiven Absorptionsbande bei 1460 nm ist die Wasserabsorption im Blattgewebe um das 1,5fache größer als die MLS und für die Ader ungefähr um das 7fache. Die MLS im Gewebe des wasserinfiltrierten Tabak Blattes sinkt bis zu 7-8 %. Dies weist auf eine Prozentzahl des Beitrages der Interzellularen zu den MLS-Prozessen im Blattgewebe.

Es wurde ein selektiver Charakter der MLS im Bereich der starken Absorptionsbanden festgestellt. Die Absorptionzunahme ist auf den Bandenflanken stärker als im Bandenmaximum, was zu einer größeren Halbwertsbreite der Absorptionsbanden führt. Eine Subtraktion des nichtselektiven MLS-Untergrundes aus den Extinktionsspektren bei der Ermittlung der Absorptionsbanden führt zu falschen Resultaten. Für die korrekte Auswertung der Absorptionswerten wurden die breiten Banden des MLS-Untergrundes und die Banden seiner Resonanzsenkung im Bereich der Absorptionsbanden von Chlorophyll und Wasser berechnen. Die entwickelte Methode des "Eintauchens" der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund erlaubt die Istwerte der Absorptionsbanden von Chlorophyll und Wasser in den Pflanzenblättern zu bestimmen. Die Istwerte können die beobachteten Banden um das 2-10fach übersteigen.

Die spektralen Streucharakteristiken des Blattes wurden ebenfalls mit Hilfe des goniometrischen Modells des bildgebenden Spektrometers gemessen und im Form der spektralen Indikatrizien analysiert. Es wurde eine Formänderung und Asymmetrie der Indikatrizien des reflektierten und transmittierten Lichtes für die Ober- und Unterseite des Blattes festgestellt. Dabei wurde der selektiven Charakter der spektralen Lichtindikatrizien nachgewiesen. Dies bestätigt ein selektives Verhalten der Streuung für die Lichtstrahlen verschiedener Wellenlänge in inhomogenen Blattgeweben. Am stärksten ist es im Bereich der Absorptionsbanden und insbesondere im Bereich der Rotbande der Chlorophylle bei 680 nm ausgeprägt.

Das inhomogene Blattgewebe mit der starken MLS zeigte die großen Abweichungen vom Normalverhalten der Lichtreflexion und -transmission, die für homogene Medien gelten. Das Licht wird infolge des hohen Streungsgrades im Blattgewebe gesperrt. Der Effekt der "Sperrung" und ein hohen Grad der Querdiffusion der Strahlung im Pflanzenblatt wurde durch eine Formänderung der Indikatrizien bestätigt, die unter verschiedenen Bedingungen (z.B. für verschiedene Spektralbereiche, für senkrechten und schrägen Lichteinfall) ausgewertet wurden. Die Winkelabweichung der Strahlen $\Delta\phi$ und die Winkelhalbwidthe der Indikatrix $\delta\phi$ könnten dabei als ein Maß der Inhomogenität der untersuchten Medien bzw. als ein Maß des MLS-Einflusses auf die Strahlungsverbreitung gelten. Für das durch ein Tabak Blatt transmittierte Licht ist die $\Delta\phi$ Winkelabweichung bis ca. 55° gleich. Es wurde festgestellt, daß die Winkelhalbwidthe der Indikatrix $\delta\phi$ fast linear mit der Abweichung $\Delta\phi$ ansteigt. Im wasserinfiltrierten Tabak Blatt erreicht die Winkelhalbwidthe der Indikatrix $\delta\phi$ für transmittierte Strahlung ihren minimalen Wert von ca. 30° . Beim senkrechten Lichteinfall haben die Indikatrizien der Reflexion eine größere Winkelhalbwidthe als die Transmissions-Indikatrizien. Beim schrägen Lichteinfall nimmt der Beitrag der diffusen Lichtstreuung ab und die Indikatrix der Reflexion verengt sich.

Bildgebende Spektroskopie der Chlorophylle in Blättern

Für die Untersuchungen der räumlichen Verteilung der Chlorophylle in Pflanzenblättern wurden erstmalig die Spektralbilder der Chlorophyllabsorption im Bereich der Rotbande bei 680 nm ermittelt. Dabei wurden die Spektralbilder der Chlorophyllabsorption unter Berücksichtigung des MLS-Einflusses ausgewertet. Dies ermöglicht, die Profilbilder der Chlorophyllverteilung über die gesamte Blattfläche zu erhalten.

Die entwickelte Methodik des "Eintauchens" der Absorptionsbanden in den MLS-Untergrund erlaubt, die Istwerte der Absorptionsbanden vom Chlorophyll in Pflanzenblättern zu bestimmen, die die beobachteten Banden in den Extinktionsspektren um das 2-10fache übersteigen können. Es wurde festgestellt, daß die realen Absorptionsbanden von Chlorophyll im Blattgewebe und in den Adern nahezu gleich sind ungeachtet ihrer sichtbaren Unterschiede in den Transmissionsspektren. Die Tabak und Rizinus Blätter stellen für das Licht bezüglich der Chlorophyllabsorption ein fast homogenes System dar.

Ortsaufgelöste Reflexions- und Transmissionsbildspektren für Tabak und Rizinus Blätter wurden bei verschiedenen Streuwinkeln sowie bei senkrechtem und schrägem Lichteinfall auf die Blattoberfläche aufgenommen. Dabei wurde die Formänderungen der Absorptionsbanden von Chlorophyll festgestellt. Bei einer Vergrößerung des Streuwinkels änderte sich die Intensität der Chlorophyll Rotbande bei 680 nm; sie wurde für transmittiertes Licht größer und für reflektiertes kleiner. Dies läßt sich durch die Entstehung des Reflexionslichtes in einer sehr schmalen Oberflächenschicht des Blattgewebes erklären.

Zum ersten Mal wurden die Raumspektren im Bereich der Absorptionsbanden von Chlorophyll für die Blattgewebe und Adern, sowie die Spektren der Aufhellung kleiner Adern erhalten. Die Raumspektren sind empfindlicher bezüglich der Veränderung des Chlorophyllzustandes und geben Unterschiede der Spektraleigenschaften im VIS Bereich für die Blattgewebe und Adern wieder. Es wurde festgestellt, daß die Durchsichtigkeit der kleinen Adern um das 15fache größer ist als die mittlere Durchsichtigkeit des Blattgewebes. Dies wird wohl zum großen Teil im VIS Bereich durch starke Chlorophyllabsorption im Blattgewebe verursacht. Dank der hohen Transmissionswerte für kleinen Adern kann das Licht durch ein Blatt zu den niedrig liegenden Pflanzenblättern durchdringen.

Bildgebende Spektroskopie von Wasser in Blättern

Für die Untersuchungen des Blattwassers wurden drei spektrale Serien der Wasserbanden definiert und analysiert: 1. Serie der Obertöne ν_{OH} , 2. Serie der Kombinationstöne $\nu_{\text{OH}} + \nu_2$ mit der Deformationsmode und 3. Serie der $\nu_{\text{OH}} + \nu_{\text{G}}$ mit den Gittermoden des Wasserstoffbrücken-Netzes von Wasser. Die wichtigen Eigenschaften dieser Banden - Halbwertsbreiten und Intensitätsveränderungen - im Zusammenhang mit der Modenordnung wurden untersucht. Es wurde festgestellt, daß die ähnlichen Spektralserien auch für die Pflanzenblätter charakteristisch sind. Dabei aber sinkt die Obertonintensität mit der Modenordnung viel schneller im Vergleich zu destilliertem Wasser und die Intensität der Kombinationsmoden nimmt dagegen zu.

Eine Methode für die Bestimmung des Wassergehaltes in den Pflanzenblättern mittels des Vergleiches der Absorptionswerte vom Blattwasser und destilliertem Wasser wurde entwickelt. Dabei wurde ein Verstärkungsfaktor der Wasserbanden infolge der MLS berücksichtigt. Die ermittelten Werte des Blattwassergehaltes stimmen gut mit der realen Wasserkonzentration im Blatt überein, die mit Hilfe der gravimetrischen Methode gewonnen wurde.

Die Methode für die Bestimmung des Wassergehaltes in den Pflanzenblättern wurde für die Analyse der Absorptionen verallgemeinert. Dafür wurden die Blattaufnahme im Maximum der Wasserabsorptionsbanden bei 1460, 1200, 980 nm und in den Bereichen der Absorptionsminima zwischen den Absorptionsbanden sowie die Aufnahme des Feldes des Beleuchtungslichtes verwendet. Mit einer ausreichenden Genauigkeit kann der Wassergehalt im Bereich der Bandenflanken bei 1420, 1600 nm ebenfalls bestimmt werden.

Zum ersten Mal wurden die detaillierten Profilbilder der Wasserverteilung in Blättern von Mesophyten und Sukkulente Pflanzen ermittelt. Dafür wurden Algorithmen der Bearbeitung von den Spektralbildern speziell entwickelt. Es ermöglichte die quantitative Analyse des Wassergehalt über die Blattoberfläche mittels der Profilbilder durchzuführen. Die effektiven Wasserdicken wurden im Blattgewebe sowie in den Haupt-, Seiten- und kleinen Adern bestimmt. Eine nicht homogene Wasserverteilung entlang der Hauptadern und eine Abnahme des Wassergehaltes zu dem Blattrand wurden festgestellt. Überprüft wurde diese Methode indem Bilder eines Blattes und einer Kontrollküvette mit destilliertem Wasser gleichzeitig aufgenommen wurden

Verschiedene Wasserzustände in Pflanzenblättern

Verschiedene Wasserzustände in Pflanzenblättern wurden entdeckt und analysiert. Es wurde festgestellt, daß der gesamte Wassergehalt in den Pflanzenblättern mittels der intensiven Banden $2\nu_{OH}$ und $\nu_{OH+\nu_2}$ (1450 und 1930 nm), und der Wasserzustand mithilfe des Verhaltens der Banden $3\nu_{OH+\nu_2}$ und $3\nu_{OH}$ (850 und 970 nm) bestimmt werden soll. Die höheren Schwingungsmoden $3\nu_{OH}$, $3\nu_{OH+\nu_2}$ könnten als ein spektraler "Detektor" der Wasserzustände von Pflanzenblättern dienen. Der energetischen Wasserzustand (EWZ) ist durch ein entsprechendes energetisches Spektrum charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurden eindeutige spektroskopische Kriterien für eine Identifizierung der EWZ in Pflanzenblättern festgestellt. Die Existenz verschiedener Wasserzustände wird durch die Transmissions- als auch Reflexionsspektren bestätigt.

In seinen spektralen Eigenschaften ist der 1. Wasserzustand dem destillierten Wasser ähnlich. Für diesen Zustand ist die Intensität der Bande des $3\nu_{OH}$ Obertones viel größer als die der benachbarten $3\nu_{OH+\nu_2}$ bzw. $4\nu_{OH}$ Wasserbanden. Der 1. Wasserzustand wurde überwiegend in den Blättern sukkulenter Pflanzen gemessen.

Für den 2. Wasserzustand in den Blättern ist eine Zunahme der Intensität des $3\nu_{OH+\nu_2}$ Kombinationstones bei 850 nm charakteristisch. Der Absorptionsgrad dieser Bande erreicht Werte bis um das 1000fache größer als die Intensität des $3\nu_{OH}$ Obertones bei 970 nm (die Integralintensität steigt dabei um das ~ 3800 fache). Der 2. Wasserzustand ist für das Gewebe der Mesophyten Blätter charakteristisch und ist vermutlich mit der Assoziationsform der Chlorophylle bzw. mit der Photosynthese-Funktion des Blattes verbunden. Dieser EWZ dominiert z.B. im Gewebe der jungen photosynthetisch aktiven Blätter. Der Effekt einer gigantischen Zunahme der $3\nu_{OH+\nu_2}$ Absorptionsbande zeigt sich als eine *anomale* Absorptionsverstärkung, da es bei einer Vereinfachung durch eine anomale Zunahme der effektiven Wasserdicke im Blatt bis zu 24-28 cm beschrieben sein sollte. Dies entspricht in keinem Fall der Realität und kann nur durch die Änderung des EWZ erklärt werden.

Für den 3. Wasserzustand wurde eine Rotverschiebung der Bande des $3\nu_{OH}$ Obertones von 970 bis zu hin 1090 nm gemessen. Dies entspricht einer stärkeren Bindung der Wassermoleküle bzw. einer Verstärkung des Wasserstoffbrücken-Netzes im Wasser, das sich ebenso im Eiszustand (im Eisgitter) äußert. Stark gebundene Zustände von eisartigen oder kollektiven Wasser wurden meistens in den Adern von Mesophyten beobachtet. Die Existenz des kollektiven Wasserzustandes in den Blättern wurde

ebenfalls durch eine Entstehung der Deformationsmoden des Wasserstoffbrücken-Netzes im Bereich bei 2500 und 1778 nm bestätigt. Zusätzlich ist für den Zustand des kollektiven Wassers eine Absorptionsabnahme der $n_{\text{V}_{\text{OH}}}$ Obertöne im Vergleich zu den Banden der $n_{\text{V}_{\text{OH}}+\text{V}_2}$ Kombinationstöne charakteristisch.

Für den 4. Wasserzustand (Dispersionswasser) werden im Bereich 700-1100 nm vier Absorptionsbanden bei 720, 795, 880 und 970 nm mit der etwa gleichen Intensität beobachtet. Bei einer spektralen Modellierung hat sich erwiesen, daß das ähnliche Verhalten der Absorptionsbanden für Wasser in einem Porösmedium (Porösglas) charakteristisch ist. Der 4. EWZ tritt bei einem niedrigeren Chlorophyllgehalt im Blattgewebe auf und wurde in Blattadern, Blattschnitten sowie in Blattsäften gemessen.

Die Wasserzustände wurden in Pflanzenblättern der verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Es wurde das Vorhandensein und der Anteil der verschiedenen Wasserzustände in den Blättern mit Hilfe der Analyse der Verhältnisse der Absorptionsbanden $\alpha=A(1460)/A(1200)$ durchgeführt. Das Verhältnis der Absorptionswerte der Banden bei 1460 und 1200 nm ist für destilliertes Wasser einem Faktor $\alpha=43$ und für das Blattwasser $\alpha=24$ gleich. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Inhomogenität vom Verhältnisbild und seiner Densitogramme mit den verschiedenen Werten des α -Faktors festgestellt, die für verschiedene Wasserzustände typisch sind. Der Prozentsatz der verschiedenen EWZ in Pflanzenblättern wurde berechnet und gezeigt, daß z. B. im Tabak Blatt ca. 30% des Wassers im 1. Zustand, etwa 40% im 2. Zustand und 20% im Zustand des schwach gebundenen Wassers vorliegt.

Es wurde eine zeitliche Dynamik bzw. eine Transformation der Wasserzustände in den Pflanzen bei physiologischen Prozessen beobachtet. Der 2. Zustand wandelte sich in der Nachtzeit in einen weniger gebundenen 5. Zustand um. Dabei verschiebt sich das Bandenmaximum von 982 nm bis zu 910 nm. Mit der Blattalterung transformiert sich der 2. Wasserzustand in den ersten. Dabei sinkt die Intensität der Bande 850 nm und die Intensität der Bande 970 nm steigt dagegen an. Es wurde die zeitliche Dynamik der Veränderung von Wasserzuständen im Blatt bei einer Wassersaugung studiert. Erstens nimmt im Blatt die Menge des kollektiven und gebundenen Wassers zu während die Menge des freien Wassers kleiner wurde. Im weiteren wandelte sich das gebundene Blattwasser in freies um.

Zum ersten Mal wurden Raumspektren für Wasser in Pflanzenblättern im Bereich des Obertones $2\nu_{\text{OH}}$ ausgewertet. Raumspektren sind empfindlicher bezüglich der Änderung des Wasserzustandes im Vergleich zu den konventionellen Absorptionsspektren. Für die Adern liegt das Maximum der Raumspektren bei 1420-1460 nm. Für Blattgewebe verschiebt sich das Maximum zu 1500 nm. Für wasserinfiltrierte Blätter haben die Raumspektren im Bereich dieses Obertones ein Minimum und das Maximum verschiebt sich in den Bereich 1000-1200 nm.

Schlußfolgerung

Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden der bildgebenden Spektroskopie und der spektralen Bestimmung des Blattwassergehaltes sowie die durchgeführten Untersuchungen der Spektralcharakteristiken von Pflanzenblättern und die Entdeckung verschiedener Blattwasserzustände öffnen neue Perspektive für die Erforschung der Pflanzenphysiologie.

Die entwickelten Methoden könnten sowohl für eine Verbesserung und Erweiterung des Verfahrens der bildgebenden Spektroskopie als auch für die Untersuchungen von inhomogenen Mikroobjekten (Physik, Biologie, Chemie) und Makroprozessen (Planet, Atmosphäre, Kosmos) von großer Bedeutung sein.

Literatur

- **Albertz J.** (1991): Grundlagen der Interpretation von Luft- und Satellitenbildern. Eine Einführung in Fernerkundung. *Wissenschaftliche Buchgesellschaft* (Darmstadt), 204 S.
- **Bach A., Coussan S., Müller A., Leutwyler S.** (2000): Water-chain clusters: Vibronic spectra of 7-hydroxyquinoline (H₂O)₂. *Chemical Physics* 112 (3):1192-1203.
- **Barth H., Buchhold K., Djafari S., Reimann B. end etc.** (1998): Hydrogen bonding in (substituted benzene) water(n) clusters with n<4. *Chemical Physics* 239:49-64.
- **Berdnik W., Muchamedjarov R.** (2001): Strahlungstransport in den Pflanzenblättern (rus). *Optik und Spektroskopie*, 90 (4): 652-663 **Бердник В., Мухамедяров Р.** (2001) Перенос излучения в листьях растений. *Оптика и спектроскопия*, 90 (4): 652-663.
- **Bornman, J., Vogelmann C.**(1988): Penetration of blue and UV radiation measured by fiber optics in spruce and fir needles. *Physiologia Plantarum* 72:699-705.
- **Bowers, P., Porter.G.** (1967): Quantum yields of triplet formation in solutions of chlorophyll. *Proc. R. Soc. London*. A296:435-441.
- **Brutschy B., Janes C., Eggert J.** (1988): Selective Intracluster Ion-Chemistry Studied by Resonant Two-Photon ionization Spectroscopy. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 92: 435.
- **Buchhold K., Reimann B., Djafari S. end etc.**(2000): Fluorobenzene and p-difluorobenzene microsolvated by methanol: an infrared spectroscopic and ab initio theoretical investigation. *J. Chem. Phys.* 112 :1844.
- **Buschbom U.** (1970): Zur Methodik kontinuierlicher Wassergehalts-Bestimmungen an Blättern mittels β -Strahlungsabsorption. *Planta* 95: 146-166.
- **Buschmann C., Lichtenthaler H.** (1998): Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152, 297-314.
- **Carleer M., Jenouvrier A., Vandaele A. end etc.**(1999): The near infrared, visible, and near ultraviolet overtone spectrum of water *J.Chem.Phys.*, 111 (6): 2444-2450.
- **Cocks T., Jenssen R., Stewart A., Wilson I., Shields T.** (1998): The HyMap Airborne Hyperspectral Sensor: The System, Calibration and Performance. *Schaepman, M. et. al. (ed.): 1st EARSeL Workshop on Imaging Spectroscopy* : 37-42
- **Csogoer Zs., Herrenbauer M., Schmidt K, Posten C. (2001)**: Light distribution in a novel photobioreactor: Modelling for optimization. *J.Appl.Physiol* 13(4):325-333.
- **Dau H., Sauer K.** (1996): Exciton equilibrium and Photosystem II exciton dynamics - a fluorescence study on Photosystem II membrane particles of spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 1273:175-190.

- **Dauwe S.** (1997): Infrarotuntersuchungen zur Bestimmung des Wasser- und Wärmehaushalts eines Blattes. *Diplomarbeit, Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen, Heidelberg.*
- **Djafari S.** (1997): Infrarot-Spektroskopie an wasserstoffbrückengebundenen heterogenen Mikroclustern mit der IR-UV-Depletion-Methode. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität . Frankfurt am Main.*
- **Gates D.** (1965): Energy, plants and ecology. *Ecology* 46: 1-13.
- **Gates D.** (1970): Physical and physiological properties of plants, In: *Remote Sensing. Nat. Acad. of Sc. (Washington) : 242-254.*
- **Gausman H.** (1985): Plant leaf optical properties in visible and near-infrared light. *In: Grad. Studies, Texas Tech. Univ. Nr 29; pp 78. Texas Tech. Pres. Lubbock.*
- **Gausman H., Allen W.** (1973): Optical parameter of leaves of 30 plant species. *Plant Physiol.* 52: 57-62.
- **Gebhardt A.** (1987): Nutzung von Fernerkundungsdaten in der Pflanzenproduktion. *Fortschrittberichte für die Landwirtschaft: 25 (5); Berlin.*
- **Gege P.** (1994): Gewässeranalyse mit passiver Fernerkundung: Ein Modell zur Interpretation optischer Spektralmessungen. *Dissertation Universität Hamburg, DLR-Forschungsbericht 94-15, Oberpfaffenhofen.*
- **Giovachini A.** (1986): An evaluation of different green vegetation indices for wheat yield forecasting. *International Archiv of Programm Remote Sensing* 26 (7): 265-267.
- **Gitelson A., Buschmann C., Lichtenthaler H.** (1998): Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152, 283-296.
- **Gitelson A., Buschmann C., Lichtenthaler H.** (1999): The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote Sensing of Environment* 69, 296-302.
- **Gitelson A., Kaufman Y., Merzlyak M.** (1996): Use of a Green Channel in Remote Sensing of Global Vegetation from EOS-MODIS. *Remote Sens. Environ.* 58: 289-298.
- **Gusev N.** (1974): *Water state in plant*, (russisch), Moscow, Nauka. = **Гусев Н.** (1974): Состояния воды в растении. Москва, Наука.
- **Güntner K.** (1986): Analysis of the daily cycle of in vivo chlorophyll a stimulated by artificial light sources. *in: GKSS (1986), Appendix 1.*
- **Engelke F.** (1985): Aufbau der Moleküle, *Teubner Studienbücher, Stuttgart.*
- **Fukshansky L** (1990): Photon transport in leaf tissue: applications in plant physiology. Chapter 2. *In: Photon Vegetation Interactions: Applications in Optical Remote Sensing and Plant Ecology.* p. 255-301, *Ross R and Myneni R (eds.), Springer Berlin.*
- **Fukshansky L, Fukshansky-Kazarinova N., Martinez V., Remisowsky A** (1991): Estimation of optical parameters in a living tissue by solving the inverse problem of the multiframe radiative transfer. *Applied Optics* 30: 3145-3153.

-
- **Fukshansky L., Martinez V. Remisowksy A.** (1992): Theoretical study of the light microenvironment in a leaf in relation of different plants. *Botanica Acta* 86: 167-182.
 - **Fukshansky L., Martinez V., Remisowksy A. end etc.** (1993): Absorption spectra of leaves corrected for scattering and distributional error: a radiative transfer and absorption statistics treatment. *Photochem. Photobiol.* 57: 538-555.
 - **Hannam R.** (1968): Leaf growth and development in the young tobacco plant. *Australian Journal of Biological Sciences* 21: 855-870.
 - **Harbinson J., Woodward F.** (1987): The use of microwaves to monitor the freezing and thawing of water in plants. *J. exp. Bot.* 38: 1325-1335.
 - **Hildebrandt G.** (1996): Fernerkundung und Luftbildmessung für Forstwirtschaft, Vegetationskartierung und Landschaftsökologie. *Wichmann Verlag* (Karlsruhe) 676 S.
 - **Huffer F., Wu H.** (1998): Markov chain Monte Carlo for autologistic regression models with application to the distribution of plant species. *Biometrics*.54(2):509-524
 - **Idso S.** (1980): Estimation of grain yields by remote sensing of crop senescence rates. *Remote Sensing Environ.* 9: 87-91.
 - **Jähne B.** (1997): Digitale Bildverarbeitung, 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin, 569 S.
 - **Jähne B., Haußecker H. Geißler P.** (Editors) (1999): Handbook Of Computer Vision and Applications, *Academic Press*, Boston, USA.
 - **Jürschik P.** (1988): Erfassung der Heterogenität der Ertragsfähigkeit mit Methoden der Fernerkundung. *Forschungsbericht des ATB.* 1998/1: 345-362.
 - **Karabourniots G., Bornman J., Liakoura V.** (1999): Different leaf surface characteristics of three grape cultivars affect leaf optical properties as measured with fibre optics: Possible implication in stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology.* 26(1): 47-53.
 - **Kirchgeßner N.** (2003): Extraktion physiologischer Koordinatensysteme von Pflanzenwurzeln und -blättern aus Bildsequenzen. *Dissertation, Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen, Heidelberg.*
 - **Korniyenko M.** (2002): Low-frequency collective vibrational modes of the system of hydrogen bonds in water.(ukrainisch) *Ukr. Phys. Journ.* 47(4): 361-364. = **Корниенко Н.** (2002): Низкочастотные коллективные колебания системы водородных связей в воде. *Украинский Физический Журнал* 47(4): 361-364.
 - **Korniyenko M.** (2000): Transverse-longitudinal split up of acoustic and optical modes of hydrogen bonds system of water. *XV International conference on spectral cine chapes, Berlin, Germany, July 2000*, p. 107.
 - **Korniyenko M.** (1999): Low-frequency collective vibrational modes of water. *International Bunsen Discussion Meeting "Metastable Water", Nordkirchen, Germany, September 1999*, p.42.
 - **Kreeb K., Schiele S.** (1986): Nondestructive recording of the water content of leaves by means of microwaves. *Angew.Bot.* 60: 41-46.

- **Krulik G.** (1980): Light transmission in window-leaved plants. *Canadian Journal of Botany* 58:1591-1600.
- **Lang M., Lichtenthaler H., Sowinska M., Summ P., Heisel F.** (1994): Blue, green and red fluorescence signatures and images of tobacco leaves. *Botanica Acta* 107:230-236.
- **Larcher W.** (1994): Ökophysiologie der Pflanzen. Leben, Leistung und Streßbewältigung der Pflanzen in der Umwelt. 5.Aufl. Ulmer, Stuttgart. 394 S.
- **Lee, D., Graham.** (1986): Leaf optical properties of rainforest sun and extreme shade plants. *American Journal of Botany* 73:1100-1108.
- **Libbert E.** (1987): Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. VEB GustavFischer Verlag Jena.
- **Lichtenthaler H., Miede J.** (1997): Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Sciences (TIPS)* 2:316-320.
- **Lichtenthaler H., Gitelson A.** (1996): Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 148: 483-493.
- **Lohmann P** (2002): Segmentation and filtering of laser scanner digital surface models. *IAPRS.* 34 (2): 311-315.
- **Lösch R.** (1994): Exchange of energy and vapor between plants and the atmosphere. *Prog.Bot.* 55: 79-95.
- **Lösch R.** (2001): Wasserhaushalt der Pflanzen. *Quelle & Meyer, Wiebelsheim*, 595 S.
- **Loughman B., Ratcliffe R.** (1984): Nuclear magnetic resonance and the study of plants. In Tinker P. (eds.): *Adv. Plant Nutr.* 1: 241-283, (New York).
- **Ma Q., Ishimaru A., Phu P.** (1990): IEE Transmission. *GeosciSens.* 22:865-872.
- **Maier S., Luedeker W., Guenter K.** (1999.): SLOP: A revised version of the stochastic model for leaf optical properties. *Remote Sensing of Environment.* 68(3). 273-280.
- **Mandoli, D., Briggs W.** (1983): Physiology and optics of plant tissues. *What's New in Plant Physiology* 14:13-16.
- **Martinez V., Remisowksy A., McClendon J., Fukshansky L.** (1992a): Estimation of the optical parameters and light gradients in leaves: Multi-flux versus two-flux treatment. *Photochem. Photobiol.* 55 857-865.
- **Martinez V., Remisowksy A., McClendon J., Fukshansky L.** (1992b): A comparative study of internal light environment in bifacial leaves of different plants. *Botanica Acta* 105: 362-366.
- **Mayer H.** (1998): Automatische Objektextraktion aus digitalen Luftbildern, *DGK Reihe C*, Nr. 494, 131 S.
- **McClendon J.** (1984): The micro-optics of leaves. I. Patterns of reflection from the epidermis. *American Journal of Botany* 71:1391-1397.

-
- **Menenti M., Rast M.** (2002): Understanding vegetation response to climate variability from space: the contribution of past, current, and future multiangular, multispectral ESA missions. *Konf. Remote Sensing*, Crete, Greece, 22-27.09.2002.
 - **Merzlyak M., Gitelson A.** (1995): Why and What for the Leaves are Yellow in Autumn? On the Interpretation of Optical Spectra of Senescing Leaves (*Acer platanoides* L.) *J. Plant Physiol.* 145: 315-320.
 - **Murphy W., Berrnstein H.** (1972): Raman spectrta and an assignment of the vibrational stretching. *Physical Chemistry* 76 (8).
 - **Nackaerts K., Coppin P.** (1999): Indirect leaf area index estimation using Licor LAI-2000 measurements and Monte Carlo techniques. [Book. Meeting] *Ceulemans R. end etc.. Forest ecosystem modelling, upscaling and remote sensing.* 201-212.
 - **Neill S., Gould K.** (1999): Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Canadian Journal of Botany.* 77:12. 1777-1782.
 - **Nutsch W.** (1991): *Allgemeine Botanik.* Stuttgart; New York: Thieme.
 - **Pakzad K.** (2001): Wissensbasierte Interpretation von Vegetationsflächen aus multitemporalen Fernerkundungsdaten, *Wissenschaftliche Arbeiten der Fachrichtung Vermessungswesen der Universität Hannover* Nr. 243 und *DGK ReiheC*, 543, 104 p.
 - **Rast M., Berger M., Silvestrin P., Del Bello U.** (1999): Scientific Objectives and Derived System Requirements of the European Space Agency 's Earth Explorer Land-Surface Processes and Interactions Mission . *Proc. of EUROPTO Conference on Sensors, Systems, and Next-Generation Satellites V, SPIE* 3870: 49-57.
 - **Ratcliffe R.** (1994): In vivo NMR studies of higher plants. *Adv. Bot. Res.* 20:44-123.
 - **Renger G., Dohnt G., Kaed A., Voss M., Gräber P.** (1987): Die Chlorophyll a Fluoreszenz als Indikator des Funktionszustandes des Photosyntheseapparates in Pflanzen. *Arch. Hydrobiol. Belh.* 29:1-24.
 - **Riehn C., Lahmann C., Wassermann B., Brutschy B.** (1992): IR depletion spectroscopy. A method for characterizing a microsolvation environment. *Chem. Phys. Lett.* 197 443.
 - **Richter R.** (2002): Atmosphärische Korrektur von Hyperspektraldaten. *Tagungsband 19. DFD-Nutzerseminar, 15.-16. 10. 2002*, S. 63-72.
 - **Scheible W, Lauerer M., Schulz E., Stiit M.** (1977): Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-rotot allocation in tobacco. *Plant Journal* 11, 671-691.
 - **Schellberg J.** (1990): Die spektrale Reflexion von Weizen - ein Beitrag zur Zustandbeschreibung landwirtschaftlicher Kulturpflanzenbestände. *Dissertation; Institut für Pflanzenbau der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.*
 - **Schläpfer D., Schöpman M., Itten, K.** (1998): PARGE: Parametric Geocoding Based on GPS Calibrated Auxiliary Data. *Descour, M.R. & Shen, S.S. (ed.): Imaging Spectrometry IV, SPIE*, 3438: 334-344.
 - **Schmidt W**(2000): Optische Spektroskopie. Einführung. *Verlag WileyVCH* Weinheim.

- **Schneider T., Buhk R., Ammer U.** (1999): Investigations on synergy and complementarity of multispectral and anisotropy information from MOMS-02/D2-Mode 3-data for land use classification in the Sinaloa district of Mexico. *International J. RemoteSensing*, 20(8):1499-1526.
- **Scholten F., Gwinner K., Wewel F.** (2002): Angewandte digitale Bildverarbeitung mit der HRSC, *PGF* 5: 317-332.
- **Schulze E., Kühn W.** (1984): Kontinuierliche und zerstörungsfreie Messung des Wassergehaltes in Pflanzen der Absorption von Mikrowellen. *Angew.Bot.* 58:465-473.
- **Schurr U., Golann T.** (1990): Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress - a descriptive study. In Monodraphy 21, *Bristol: British Society of Plant Growth Regulation*, 201-204.
- **Slavik B.** (1974): Methods of studying plant water relations. *Ecol. Stud.* 9, Chech. Acad. Sci. Prag.
- **Smith R.** (2001): Introduction to Hyperspectral Imaging. *MicroImages, Inc.*123-127.
- **Smith W., Vogelmann T., DeLucia E., Bell D., Shepherd K.** (1997): Leaf form and photosynthesis. *BioScience* 47: 785-793.
- **Tucker C.** (1980): Remote sensing of leaf water content in the near infrared. *Remote Sensing of Environment* 10:23-32.
- **Verstraete M., Menenti M., Peltoniemi J.** (2000): Observing land from space: science customers and technology, *Kluwer Academic Publishers*, 352.
- **Vogelmann T., Han T.** (2000): Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescenc profiles. *Plant Cell & Environment.* 23(12): 1303-1311.
- **Vogelmann T, Bjorn L.**(1986):Plants as light traps. *Physiol. Plantarum* 68:704-708.
- **Vogelmann T., Bjorn L.** (1983): Response to directional light by leaves of a sun-tracking lupine (*Lupinus succulentus*). *Physiologia Plantarum* 59:533-538.
- **Walburg G.** (1982): Effects of nitrigen nutrition on the groth, yield and reflectance of corn canopies. *Agron. Journal* 74: 677-683.
- **Wewel F., Scholten F., Neukum G., Albertz J** (1998): Digitale Luftaufnahme mit der HRSC – Ein Schritt in die Zukunft der Bildverarbeitung, *PGF* 6 : 337-348.
- **Willert D., Matyssek R., Herppich W.** (1995): Experimentelle Pflanzenphysiologie: Grundlage und Anwendung. - *Stuttgart; New York: Thieme.* 344 S.

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

- **Smolyar N., Korniyenko M., Jähne B., Schurr U.** (2002): Studying of different water states distribution in plant leaves using vibration and imaging spectroscopy. *Botanikertagung 2002, Freiburg, Germany, September 2002, Abstractband*, p.239.
- **Smolyar N., Korniyenko M., Jähne B., Schurr U.** (2002): Spectral determination of the water content in plant leaves. Influence of multiple light scattering in leaves on the amplification of water and chlorophyll absorption bands. *Botanikertagung 2002, Freiburg, Germany, September 2002, Abstractband*, p.239.
- **Korniyenko M., Kutovyi S., Piddubetska O., Smolyar N.** (2002): The collective vibration modes of hydrogen bonds as biometer of the water states in vegetal fruits and leaves. *Botanikertagung 2002, Freiburg, Germany, September 2002, Abstractband*, p.395.
- **Kraus S., Degreif K., Smoljar N., Korniyenko M., Kalkenings R., Wagner T., Wenig M., Jaehne B., Platt U.** (2003.): Spectroscopic imaging, *Lecture Notes in Computer Science, LNCS, Chapter 1*, p. 5-27, Springer Verlag.
- **Garbe C., Smolyar N., Korniyenko M., Schurr U.**(2003.): Water relations in plant leaves, *Lecture Notes in Computer Science, LNCS, Chapter 19*, p.377-401, Springer Verlag.
- **Korniyenko M., Kutovyi S., Piddubetska O., Smolyar N.** (2003): The collective vibration modes of hydrogen bonds as biometer of the states of water in vegetal fruits and leaves. *2nd International Conference "Physics of liquid matter: modern problems"* Kiev, 2003.
- **Korniyenko M., Roth K., Smolyar N., Vogel H.** (2003): States of adsorbed and capillary water in porous media studied with NIR imaging spectroscopy. *2nd International Conference "Physics of liquid matter: modern problems"* Kiev, 2003.

Anhang 1

WS Absorption-Auswertung von Alpha NIR-Bildern

B.Jähne, N.Smoljar 11.07.2002

Bildgrößen

ny := 252; nx := 316; nt := 16;

```
short header[64];
short gain[ny][nx];
short offset[ny][nx];
short bad[ny][nx];
ushort seq[nt][ny][nx];
ushort seqc[nt][ny][nx];
```

```
float dun1[ny][nx];
float dun2[ny][nx];
```

```
float hal1[ny][nx];
float hal2[ny][nx];
float hal3[ny][nx];
```

```
float blat1[ny][nx];
float blat2[ny][nx];
float blat3[ny][nx];
```

```
float tr1[ny][nx];
float tr2[ny][nx];
float tr3[ny][nx];
float tr[ny][nx];
```

```
float k1[1];
float k2[1];
```

```
float abs[ny][nx];
#float absmm[ny][nx];
```

```
float x1[ny][nx];
float x2[ny][nx];
```

```
short handle;
string fname;
```

```
display d1, type "inspector", tr1;
d1.text = "Extinktion 1";
d1.range = {0.0, 2.0};
```

```
display d2, type "inspector", tr2;
d2.text = "Extinktion 2";
d2.range = {0.0, 2.0};
```

```

display d3, type "inspector", tr3;
d3.text = "Extinktion 3";
d3.range = {0.0, 3.0};

display d4, type "inspector", abs;
d4.text = "Absorption";
d4.range = {0.0, 0.5};

display d5, type "inspector", absmm;
d5.text = "Absorption_mm";
d5.range = {0.0, 1.5};

# Sequenznamen bestimmen
operator getseq();
    fname = RequestFiles();
    fname;
endoperator;

# Bildsequenz lesen und mit Offset und Gain korrigieren
operator readseq(fname);
    short cnt; SetFormat(cnt, "Bild %i");
    handle = FileOpenRead.raw(fname);
    header = FileRead(handle);
    header = ByteSwap();
    gain = FileRead(handle);
    gain = ByteSwap();
    offset = FileRead(handle);
    offset = ByteSwap();
    bad = FileRead(handle);
    bad = ByteSwap();
    scan (seq|0, seqc|0);
        cnt = Inc();
        seq = FileRead(handle);
        seq = ByteSwap();
        x1 = seq;
        x1 = Sub(2048.0);
        x1 = Add(x1, offset); # Offset addieren
        x2 = gain; x2 = Mul(x2, 0.001);
        x1 = Mul(x1, x2);    # Mit gain multiplizieren
        seqc = x1;
        cnt;
    endscan;
    FileClose(handle);
    ivView(d1);
endoperator;

# Mittleres Dunkelbild-1 berechnen
operator dun1();
    dun1 = Sum.clear&mean(seqc);
endoperator;
# Mittleres Dunkelbild-2 berechnen
operator dun2();
dun2 = Sum.clear&mean(seqc);
endoperator;

```

```
# Mittleres Halogen-1 Bild, Dunkelbild abziehen
operator hal1();
    hal1 = Sum.clear&mean(seqc);
    hal1 = Sub(dun2);
endoperator;

# Mittleres Halogen-2 Bild, Dunkelbild abziehen
operator hal2();
    hal2 = Sum.clear&mean(seqc);
    hal2 = Sub(dun2);
endoperator;

# Mittleres Halogen-3 Bild, Dunkelbild abziehen
operator hal3();
    hal3 = Sum.clear&mean(seqc);
    hal3 = Sub(dun2); #für 1700
endoperator;

# Mittleres Transmission-1 Bild, Dunkelbild abziehen
operator blat1();
    blat1 = Sum.clear&mean(seqc);
    blat1 = Sub(dun2);
endoperator;

# Mittleres Transmission-2 Bild, Dunkelbild abziehen
operator blat2();
    blat2 = Sum.clear&mean(seqc);
    blat2 = Sub(dun2);
endoperator;

# Mittleres Transmission-3 Bild, Dunkelbild abziehen
operator blat3();
    blat3 = Sum.clear&mean(seqc);
    blat3 = Sub(dun2);
endoperator;

#####

## Mittleres Dunkelbild

    readseq("dunk_16ms.bin");
    dun1();
    readseq("dunk_500us.bin");
    dun2();

## Extinktion 1
operator tr1();

    readseq("tab_1300.bin");
    hal1();
    readseq("UK_1300.bin");
    blat1();
```



```
        tr1 = Div(blat1,hal1);

endoperator;
tr1();

## Extinktion 2
operator tr2();

        readseq("tab_1500.bin");
        hal2();
        readseq("UK_1500.bin");
        blat2();

        tr2 = Div(blat2,hal2);

endoperator;
tr2();

## Extinktion 3
operator tr3();

        readseq("tab_1460.bin");
        hal3();
        readseq("UK_1460.bin");
        blat3();

        tr3 = Div(blat3,hal3);

endoperator;
tr3();

## Mittelwert der Extinktion bei 1460 nm
k2 = 0.4; # für 1460 nm
tr = Mul(tr,k2);
tr = Add(tr1,tr);

## Absorption
abs=Div(tr2,tr);
abs=Sub(1.0,abs);

## Blattwasserschicht in mm
absmm=Div(abs,1.04448); # bei 1460 nm

Write("abs_tab460.tif",abs);
Write("absmm_k_1460.tif",absmm);
```

Anhang 2

WS Absorption-Auswertung von PixelFly-Bildern

N Smoljar, 26.07.2002

Bildgroessen

ny := 1024;

nx := 1280;

Bilder

float dunkel1[ny][nx];

float dunkel2[ny][nx];

float dunkel3[ny][nx];

float dunkel4[ny][nx];

float halogen1[ny][nx];

float halogen2[ny][nx];

float blatt1[ny][nx];

float blatt2[ny][nx];

float ext1[ny][nx];

float ext2[ny][nx];

float abs_dif[ny][nx];

float k1[1];

float k2[1];

display d1, type "inspector", ext1;

d1.text = "Extinktion 1";

d1.range = {0.3,1.0};

display d2, type "inspector", ext2;

d2.text = "Extinktion 2";

d2.range = {0.3,1.0};

display d3, type "inspector", abs_dif;

d3.text = "Absorption";

d3.range = {-2.0,6.0};

dunkel1 = Read("dunk_20ms.raw");

dunkel2 = Read("dunk_70ms.raw");

dunkel3 = Read("dunk_10ms.raw");

dunkel4 = Read("dunk_40ms.raw");

halogen1 = Read("UK_950_20ms.raw");

halogen1 = Sub(dunkel1);

blatt1 = Read("rf_unt_950_70ms_k2mm.raw");

blatt1 = Sub(dunkel2);

k1 = 0.2857;

blatt1 = Mul(blatt1,k1);

```

# Extinktion 1
operator ext1();
    ext1 = Div(halogen1, blatt1);
    ext1 = Log(ext1);
endoperator;

ext1();

halogen2 = Read("UK_850_10ms.raw");
halogen2 = Sub(dunkel3);

blatt2 =Read("rf_unt_850_40ms_k2mm.raw");
blatt2 = Sub(dunkel4);
k2 = 0.25;
blatt2 = Mul(blatt2,k2);

# Extinktion 2
operator ext2();
    ext2 = Div(halogen2, blatt2);
    ext2 = Log(ext2);
endoperator;

ext2();

# Absorption
abs_dif=Sub(ext1,ext2);
abs_dif=Div(0.02009);

Write("ext_rfj_unt_950_70ms.raw",ext1);
Write("ext_rfj_unt_850_60ms.raw",ext2);
Write("abs_mm_rf_950_850_k2mm.raw",abs_dif);

```

Anhang 3

WS Wellenlängeichung der Bildspektren

```
# N. Smoljar, D. Engelmann, 13.12.2001.
```

```

string filename;
short res_size_x;
short res_size[2];
short o_size_x;
short o_size_y;
#=====
# Bildgroessen
# Ergebnisbild
res_size_x = 640;
res_size_y := 20;

```

```

# Ausgangsbild
o_size_x = 640;
o_size_y = 20;
#float x_cut;
# Obere Schranke von Ausgangsbild
x_cut := 640;
# Dateiname Ausgangsbild
filename = " E:\Kalibrierung\tab \tab_ET10.tif";
#=====
short osize[2];
osize[0] = res_size_y;
osize[1] = x_cut;
res_size[0] = res_size_y;
res_size[1] = res_size_x;

short bildo[480][o_size_x];
short bild[o_size_y][x_cut];
short res_bild[res_size_y][1200];
float fbild[o_size_y][o_size_x];
float a;
float b;
float c;
float t;
float lut[256];

framebuf fb1 {
    string type,
    short dispsize[2],
    float range[2],
    short viewpos[2]
};
fb1.type = "win";
fb1.dispsize = osize;
fb1.range = {0,4095};
fb1.viewpos = {0,0};

framebuf outbild {
    string type,
    short dispsize[2],
    float range[2]
};
outbild.type = "win";
outbild.dispsize = res_size;
outbild.range = {0,4095};

operator y=func(a,b,c,x);
    y = Div(x, c);
    y = Exp(y);
    y = Mul(b,y);
    y = Add(y, a);
endoperator;

operator rbild = make_morph(xmin, xmax,a,b,c);
    short x;
    float f1;
    float f2;
    float t;
    short y;
    short x1;
    short x2;

```

```

short dx;
float d;
float r;
float g1;
float g2;
float g;
short i;
short j;
short k;
short xm;
short n;
short o;

j = 0;
i = 0;
k = x_cut;
xm = Sub(k, 1);
while(j < o_size_y);
repeat(xm);
  t = i;
  # Funktion func an Stelle i und i+1 auswerten
  f1 = func(a,b,c,t);
  x2 = Add(i,1);
  t = x2;
  f2 = func(a,b,c,t);

  t = Sub(f2,f1);
  dx = t;
  d = Div(1.0, t);
  if (dx >= 1);
  # Interpolation, linear
  k = 0;
  r = i;
  n = Add(i, 1);
  g1 = bild[j][i];
  g2 = bild[j][n];
  while (k <= dx);
    t = i;
    g = Sub (r, t);
    t = Sub(g2, g1);
    g = Mul(g, t);
    g = Add(g, g1);
    t = func(a,b,c,r);
    n = t;
    rbild[j][n] = g;
    k = Inc();
    r = Add(r, d);
  endwhile;
  # -----
  else;
    k = f1;
    rbild[j][k] = bild[j][i];
  endif;
  i = Inc();
endrepeat;
j = Inc();
i = 0;
endwhile;
endoperator;

```

```
float mi;
float ma;
float gmin;
float gmax;
short xo;
short x1;
short x2;

# Parameter für Funktion func()
a = 440.79;
b = 11.76;
c = 163.90;

bildo = Read(filename);
# byte dummy[][];
# dummy = Read(filename);
# bildo = dummy;
# Bildausschnitt
x1 = 200;
x2 = Add(x1, o_size_y);
bild = bildo[x1:x2];

fbl.range[1] = x_cut;
fbl=bild;
# Wertebereich Ergebnisbild !!!
t = func(a, b, c, 0.0);
gmin = t;
mi = x_cut;
mi = Sub(mi, 1.0);
t = func(a, b, c, mi);
gmax = t;

# Display gr"osse
res_size_x = gmax;
outbild.dispsize[1] = res_size_x;

# Morph Funktion aufrufen
res_bild = make_morph(gmin, gmax, a, b, c);

# Ergebnisbild skalieren und ausgeben
fbild = res_bild;
mi = MinOf(fbild);
ma = MaxOf(fbild);
mi; ma;

outbild.range[0] = mi;
outbild.range[1] = ma;
outbild = res_bild;

Write("E:\Kalibrierung\tab_ET10-kalibr.tif",res_bild);

short zeile[1200];
short spalte[1200][1];
zeile = res_bild[10][];

spalte = Transpose(zeile,"xy");

Write("E:\Kalibrierung\tab_ET10_kalibr.asc",spalte,"replace");
```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen herzlichen Dank aussprechen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

На этом месте я хотела бы выразить благодарность всем кто непосредственно или косвенно способствовал осуществлению этой работы.

Als erstes möchte ich **meine lieben Eltern und Geschwister** aus der Ukraine erwähnen, die mich immer in guten und schwierigen Zeiten mit Ihrer Liebe und Fürsorge begleitet haben und unter persönlichem Verzicht, eine, den Verhältnissen entsprechend, sehr gute Ausbildung ermöglicht haben.

Вопервых я хотела бы назвать здесь **моих дорогих родителей, братьев и сестру** из Украины, которые всегда поддерживали меня с любовью и заботой в хорошие и трудные времена и которые, отказывая себе во многом, помогли мне получить очень хорошее образование.

Herrn **Prof. Dr. Bernd Jähne** und **Prof. Dr. Uli Schurr** danke ich ganz herzlich für die Überlassung des hoch interessanten Themas, für die Betreuung und für ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit. Ebenso herzlich möchte ich beiden Professoren für die konstruktive Kritik und für das Verständnis meiner sprachlichen Probleme danken.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Kurt Roth** für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und für das aufrichtige Interesse an der Arbeit. Seine konstruktive Bemerkungen haben mich dazu gebracht, dieses Manuskript wesentlich zu verbessern.

Von ganzem Herzen danke ich meinem **Freund Dr. Mykola Korniyenko**, der besonders viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und nie den Glauben an mich verloren hat. Ich danke Nik für liebevolle Unterstützung, für zahlreichen Ideen und Motivationen. Die Durchführung und das Schreiben der ganzen Arbeit wären ohne Nik bestimmt nicht so schöpferisch verlaufen. Mit seiner Schaffenskraft und seiner Fähigkeit zu der kreativen Arbeit gelang es ihm, mich zu lehren, viel Freude von der Forschung zu bekommen.

От всего сердца благодарю моего друга **Николая Корниенко**, за то что он особенно очень много сделал для осуществления этой работы и никогда не терял веру в меня. Я благодарю Ника за его любящую поддержку, за многочисленные идеи и мотивации. Проведение и написание всей работы были бы не такими творческими без Ника. Его талант и его способность к творческой работе научили меня получать большую радость от исследований.

Der **ganzen Arbeitsgruppe** danke ich für die freundschaftliche Hilfe, für die Beantwortung vielen Fragen, für das angenehme Arbeitsklima und für das Korrekturlesen. Stellvertretend für alle möchte ich hier **Günther, Achim, Christoph, Uwe, Michael, Reinhard, Stefan, Hermann und Kai** nennen.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Freundinnen **Nina** und **Kristiane**, die mir in vielen Dingen eine große Unterstützung waren. Die ganze Zeit in Heidelberg wäre ohne Nina und Kristiane nicht so angenehm verlaufen. Nina hat durch ihre ständige Hilfeleistungen und das gründliche Korrekturlesen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Mechthild Bunn aus Berlin schulde ich besonders herzlichen Dank. Ich nenne sie eine "Sonnenfrau", weil sie mit ihrem leuchtenden Herz und ihrer grenzenlosen Liebe das Leben von vielen Menschen und auch mein Leben erwärmt und erleuchtet hat.

Vielen Dank an **ehemaligen Kollegen des Fachgebiets für Obstbau** der Humboldt Universität zu Berlin. Meine Forschungsarbeit in Deutschland habe ich da begonnen und alle Kollegen haben damals mir geholfen die ersten Aufenthaltsprobleme zu erleichtern. Mit Nachdruck danke ich **Prof. Dr. Peter Lüdders** für die Betreuung meiner ersten Forschungsarbeit und für sein Vertauen an mich. Nicht zuletzt danke ich **Dr. Georg Ebert, Karin Mühe, Ursula Twardawske, Hannja Bridg** und **Mehdi Choraishi**, die für mich immer da waren wenn ich sie brauchte.