

**ЕКСПРЕСНА ОЦІНКА СТІЙКОСТІ ГІРКОКАШТАНІВ ЗВИЧАЙНОГО
І ЧЕРВОНОГО ПРОТИ КОМПЛЕКСУ ЧИННИКІВ ДОВКІЛЛЯ
ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ**

**К. Є. Шаванова, кандидат біологічних наук
М. В. Таран, аспірантка***

**М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук
Національний університет біоресурсів
і природокористування України**

**О. А. Марченко, кандидат біологічних наук
Інститут водних проблем і меліорації НААН України**

*Встановлено ефективність методу фотоіндукції флуоресценції хлорофілу для визначення функціонального стану фотосинтетичного апарату гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) та гіркокаштана червоного (*Aesculus pavia* L.) у трьох екологічних зонах м. Києва. Виявлено, що рослини досліджуваних видів у трьох екологічних зонах значно різняться за показниками індукційних змін флуоресценції хлорофілу, які відображають процеси перетворення енергії на початкових етапах фотосинтезу. Встановлено, що коефіцієнт K_{PI} на плато кривої Каутського може використовуватися, як тестовий при ранньому доборі стійких форм гіркокаштанів проти комплексу чинників довкілля.*

***A. hippocastanum*, *A. pavia*, фізіологічний стан, хлорофіл, індукція флуоресценції, експрес-діагностика.**

За останні роки стан зелених насаджень у містах України суттєво погіршився внаслідок несприятливої дії цілого ряду техногенних чинників: викидів автотранспорту, важких металів, засолення, високих температур, хвороб та шкідників. При цьому значна кількість рослин перебуває в пригніченому критичному фізіологічному стані та не витримує антропогенного навантаження, що призводить до порушення в них процесів метаболізму, передчасного їх старіння та усихання [1, 3].

За даними Київзеленбуду в урболандшафті Києва гіркокаштан звичайний складає 22 % деревних насаджень, але за останній час, внаслідок сумарної дії високого ступеня антропогенного впливу, ураження рослин шкідниками та хворобами, значна його кількість в м. Києві знаходиться в критичному стані [2, 8]. В останні роки до того ж спостерігається масове поширення каштанової мінуючої молі *Cameraria ohridella* Desch. & Dim. та аскоміцету *Guignardia aesculi* (Peck) Stev. [3, 8]. Все це призводить до виснаження рослин і зниження їх декоративності.

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб

© К. Є. Шаванова, М. В. Таран,
М. Ф. Стародуб, О. А. Марченко, 2014

Нині існує великий методичний арсенал для діагностики вірусних, бактеріальних та грибних інфекцій рослин. Це, перш за все, біологічне тестування вірусних хвороб на трав'янистих рослинах-індикаторах, методи електронної та імунофлуоресцентної мікроскопії, різні модифікації імуноферментного аналізу, реакції імунодифузії, серологічні тести [4]. Проте усі перелічені вище діагностичні підходи є досить складними, трудомісткими, а здебільшого вони потребують складного та коштовного лабораторного обладнання. До того ж єдиний відомий на цей час метод, що широко застосовується для експресного визначення ураження рослин каштановою міллю *in vivo* у польових умовах, полягає в візуальному обстеженні. Безумовно, що він не відповідає сучасним вимогам практики щодо попередньої діагностики захворювань.

Враховуючи вищевикладене, стає зрозумілим нагальна потреба в розробці та впровадженні інформативних і експресних методів для отримання діагностично важливих показників на ранньому етапі розвитку патологічного процесу у рослин. До того ж методи, що застосовуються, повинні бути економічно доцільними та не наносити руйнівної дії тканинам рослин. Серед методичних підходів, що нині розробляються для швидкої діагностики впливу екстремальних чинників довкілля на рослини, звертають увагу, перш за все, на ті, що базуються на визначенні стану фотосинтетичного апарату. Процес фотосинтезу є надзвичайно важливим у життєдіяльності рослин і надзвичайно чутливим до впливу абіотичних та біотичних чинників. Сучасні методи дозволяють отримувати інформацію про стан фотосинтетичного апарату рослин та оцінювати ступінь впливу на нього несприятливих чинників довкілля. Суттєвою перевагою їх є те, що вони здатні реєструвати навіть незначні зміни в активності фотосинтетичного апарату та дозволяють це робити в польових умовах і досить швидко та просто [4, 16]. Метод індукції флуоресценції хлорофілу базується на вимірюванні рівня флуоресценції хлорофілу у рослин при інтенсивному освітленні після нетривалого періоду темної адаптації. Цей метод є достатньо чутливим та дозволяє швидко встановити зміни в фотосинтетичному апараті під дією стресу та регенераційний потенціал інтактних рослин.

Мета досліджень – встановлення ефективності застосування методу, що базується на оцінці інтенсивності індукції флуоресценції хлорофілу для визначення функціонального стану фотосинтетичного апарату листків гіркокаштана звичайного та гіркокаштана червоного в трьох екологічних зонах м. Києва.

Матеріали та методика досліджень. Для дослідів використовували рандомізовано відібрані рослинні зразки двох видів гіркокаштана: звичайного та червоного з зелених насаджень м. Києва в трьох екологічних зонах: Ботанічний сад Національного університету біоресурсів і природокористування України (контроль), паркові зони: Голосіївський, Маріїнський парки та вуличні насадження біля автомагістралей.

Виміри здійснювалися на невідокремлених листках гіркокаштанів у місцях зростання рослин. Стан фотосинтетичного апарату рослин

визначали, використовуючи прототип портативного приладу “Флоратест”, розроблений в Інституті кібернетики імені В.М.Глушкова НАН України. Прилад дає змогу реєструвати індукційну криву флуоресценції (“криву Каутського”), за параметрами якої можна аналізувати перебіг процесів як світлової, так і темної фаз фотосинтезу. Форма кривої індукції флуоресценції хлорофілу віддзеркалює зміни у будь-якій ланці процесу фотосинтезу, що зумовлені дією чинників навколишнього середовища та ендогенними [11, 16].

Індукцію флуоресценції хлорофілу вимірювали триразово з тривалістю циклу 3 хв, темнова адаптація перед вимірюванням становила 10 хв, для побудови кривих ІФХ та їх аналізу використано програмний засіб Microsoft Office Excel.

Основними показниками фотоіндукції флуоресценції були: F_0 – фоновий рівень флуоресценції; F_{pl} – рівень флуоресценції на час досягнення тимчасового сповільнення зростання її сигналу, так зване “плато”; F_{max} – максимальне значення флуоресценції; F_{st} – стаціонарний рівень її через 3 хв. після початку освітлення. Всі показники індукційної кривої представлено у відносних одиницях еталона флуоресценції (світлофільтр ОС-14), з емісією в тому ж спектральному діапазоні, що і флуоресценція хлорофілу листка [9, 10].

Також визначали: $K_i = (F_{max} - F_{st})/F_{st}$ – коефіцієнт індукції флуоресценції, $F_v = F_{max} - F_0$ – варіабельна флуоресценція, $(F_{max} - F_0)/F_{max} = F_v/F_{max}$ – залежить від ефективності фотохімічних реакцій ФС2, $(F_{pl} - F_0)/F_v$ – якщо інтенсивність діючого світла достатня для досягнення стану максимальної відновленості QA, у момент досягнення рівня F_{max} , тоді параметр $(F_{pl} - F_0)/F_v$ відповідає відносній кількості QB-невідновлюючих комплексів ФС2, які не беруть участі у лінійному транспорті електронів, $(F_{max} - F_{st})/F_{st}$ – величина гасіння флуоресценції, на яку впливають як фотохімічні (фіксація CO₂), так і нефотохімічні процеси (теплова дисипація енергії збудженого стану молекул хлорофілу) [6, 7, 10].

Результати досліджень. За даними роботи [13] зміни в інтенсивності флуоресценції хлорофілу фотосистеми 2 (ФС2) віддзеркалюють окисно-відновні процеси в реакційному центрі (РЦ) цієї фотосистеми. Поглинута енергія квантів світла може переноситися трьома шляхами: фотохімічні реакції, дисипація в вигляді тепла та випромінення світла – флуоресценція хлорофілу. Ці процеси конкурують між собою так, що підвищення ефективності одного призводить до пригнічення двох інших. У нормальних умовах рівень флуоресценції незначний (1 – 2 % загального поглинутого світла), що свідчить про активне використання клітинами енергії поглинутого світла. Після освітлення адаптованих до темноти листків рослин спочатку протягом декількох секунд спостерігається різкий підйом інтенсивності флуоресценції хлорофілу – швидка фаза, а потім уже протягом декількох хвилин відбувається поступове зниження через певні стадії – від повільної фази до стаціонарного рівня F_{st} .

Для характеристики фотосинтетичного апарату в умовах стресу на рівні листка на етапі швидкої фази частіше використовують співвідношення

варіабельної флуоресценції F_v до максимального рівня F_{max} , яке вважається показником потенційної фотосинтетичної активності листка [14, 15]. Однак цей параметр має деякі обмеження, оскільки він належить виключно до первинних фотохімічних процесів у фотосистемі 2 і лише протягом перших 100 – 500 мс.

Дія будь-якого несприятливого чинника (у нашому випадку це можливе ураження каштановою мінуючою міллю *Cameraria ohridella*) зменшує атрагуючу здатність циклу Кальвіна, що призупиняє потік електронів, і реакційні центри переходять у неактивний (закритий) стан. При цьому поглинута енергія світла вже не може використовуватися в процесі фотосинтезу і тому флуоресценція хлорофілу зростає в усьому часовому діапазоні реєстрації її індукційних змін [7, 13].

У рослин гіркокаштана червоного, стійких проти мінуючої молі, спостерігалось зростання інтенсивності F_o на 23,3 %, а також збільшення максимальної флуоресценції F_{max} на 19,0 % та стаціонарного рівня F_{st} – на 59,1 %. Такі зміни в характері індукції флуоресценції обумовлені збільшенням кількості молекул хлорофілу в сприйнятливих рослинах, який не передає енергію збудження реакційним центрам (F_o), а також супроводжуються зростанням “інтеграла індукційних втрат”, тобто збільшенням кількості енергії, що не працює на фотосинтез і висвічується також при більш повільних фазах індукції, що віддзеркалюються на кривій Каутського.

Спектральні дослідження флуоресценції інфікованих листків гіркокаштана виявили зростання співвідношення інтенсивностей коротко- та довгохвильової флуоресценцій хлорофілу – $F_{st}^{680}/F_{st}^{740}$, що свідчить про збільшення ступеня відновлення переносників електрон-транспортного ланцюга між реакційними центрами фотосистем 1 та 2 [12]. Слід відмітити також зменшення на 21 % коефіцієнта індукції флуоресценції $K_i = (F_{max} - F_{st})/F_{max}$, який характеризує ефективність перебігу темнових фотосинтетичних процесів і передусім активності рибульозо-біфосфаткарбоксилази – основного ферменту циклу Кальвіна.

У зразках, сприйнятливих до ураження рослин, значення F_o зменшилося на 25,0 % порівняно зі стійкими їх формами, що можливо пов'язано з блокуванням ресинтезу хлорофілу, деградацією та руйнуванням структури хлоропластів, зменшенням їх кількості під впливом комплексу чинників довкілля. Це, в свою чергу, сприяє спаду максимальної флуоресценції (F_{max}) на 29,0 % порівняно із зростанням її значення на 15,0 % у стійких рослин.

Найістотніші зміни відбуваються з інтенсивністю темнових фотосинтетичних процесів, що віддзеркалюють повільні зміни індукції флуоресценції хлорофілу. На фоні загального спаду емісії флуоресценції хлорофілу у стійких рослин відмічено зростання стаціонарного рівня F_{st} на 52,2 %. За таких умов коефіцієнт індукції флуоресценції K_i зменшується у порівнянні зі сприйнятливими рослинами на 73 %. Це свідчить про блокування перебігу фотосинтетичних процесів у хлоропластах листків гіркокаштана звичайного.

Серед параметрів індукції флуоресценції хлорофілу коефіцієнт плато $K_{pl} = (F_{pl} - F_o) : (F_{max} - F_o) = dF_{pl} / F_v$ (де $dF_{pl} = F_{pl} - F_o$ – амплітуда плато флуоресценції; $F_v = F_{max} - F_o$ – варіабельна флуоресценції) найбільш виразно характеризує стійкість гірकोкаштана звичайного до біотичних чинників, а саме до їх патологічної дії на функціональний стан рослин. Встановлено значне збільшення K_{pl} у гірकोкаштана звичайного з вуличних насаджень біля автомагістралей в порівнянні з таким же варіантом у гірकोкаштана червоного (відповідно 0,340 та 0,114). Саме співвідношення dF_{pl} / F_v (K_{pl}), що характеризує відносну кількість неактивних реакційних центрів відносно загального числа реакційних центрів, визначено як тестовий показник на високу адаптивність рослин гірकोкаштана червоного (див. таблицю).

Значення параметра dF_{pl} / F_v , який відповідає відносній кількості Q_p -невідновлюваних комплексів ФС2, що не беруть участі в лінійному транспорті електронів, збільшується (відповідно в варіантах дослідження з гіркокаштаном звичайним у 2,9 і 2,7 рази). Слід зазначити, що емісія флуоресценції хлорофілу посилюється і для повільних фаз у максимумі індукційної кривої F_{max} на 15,5 – 19,4 %, а на її стаціонарному рівні F_{st} – більш ніж у 2,2 рази. Відповідно і коефіцієнт індукції флуоресценції зменшується на 57 – 58 %, що свідчить про суттєве інгібування як фотофізичних, так і фотохімічних процесів фотосинтезу у сприйнятливих рослин. Найменше ці показники знижувалися у рослин обох видів, відібраних у паркових зонах, що свідчить про значно нижчий антропогенний вплив на них, ніж у тих, що знаходилися на автомагістралях. А, значить, у рослин паркової зони був і відповідно кращий загальний фізіологічний стан.

Отже, рослини досліджуваних видів у трьох екологічних зонах значно різняться за показниками індукційних змін флуоресценції хлорофілу, які відображають процеси перетворення енергії на початкових етапах фотосинтезу. Так, параметр F_o у гіркокаштана звичайного, сприйнятливого до шкідника, зростає, що характеризує збільшення кількості молекул хлорофілу, що не передають енергію на реакційні центри ФС2. Ці показники були найвищі у рослин, що були відібрані серед вуличних насаджень біля автомагістралей міста.

Залежність функціонування фотосинтетичного апарату листків гіркокаштана звичайного та червоного залежно від локацій

Характеристика фенотипу	F_v	F_v / F_o	$(F_{pl} - F_o) / F_v$	F_{max} / F_{st}	K_i	F_v / F_{max}	$(F_{pl} - F_o) / F_{max}$	$(F_{max} - F_{pl}) / F_{max}$
Гіркокаштан звичайний (вуличні насадження біля автомагістралей)	0,517± 0,006	0,868± 0,022	0,340± 0,009	3,677± 0,014	0,728± 0,010	0,465± 0,017	0,158± 0,011	0,307± 0,007
Гіркокаштан звичайний (контроль)	0,625± 0,013	1,163± 0,024	0,375± 0,014	3,500± 0,008	0,714± 0,012	0,538± 0,008	0,202± 0,004	0,336± 0,018
Гіркокаштан звичайний (паркові зони)	0,664± 0,014	0,782± 0,016	0,388± 0,006	3,876± 0,024	0,742± 0,020	0,439± 0,017	0,039± 0,002	0,400± 0,013

Гіркокаштан червоний (вуличні насадження біля автомагістралей)	0,772± 0,009	1,054± 0,026	0,114± 0,013	4,163± 0,032	0,760± 0,017	0,513± 0,008	0,058± 0,004	0,455± 0,013
Гіркокаштан червоний (контроль)	0,840± 0,012	1,195± 0,034	0,244± 0,006	4,158± 0,036	0,759± 0,027	0,544± 0,014	0,076± 0,003	0,468± 0,014
Гіркокаштан червоний (паркові зони)	0,684± 0,021	2,121± 0,028	0,328± 0,017	3,552± 0,042	0,718± 0,013	0,680± 0,011	0,291± 0,004	0,388± 0,012

Про зростання ступеня відновленості реакційних центрів ФС2 хлоропластів свідчить і підвищення максимального рівня флуоресценції хлорофілу Fmax.

Висновки

Вважаємо, що метод індукції флуоресценції хлорофілу є перспективним для практичного використання при ранній експрес-діагностиці стану рослин. Але зв'язок між змінами параметрів флуоресценції та станом фотосинтетичного апарату рослин у цілому до кінця не встановлений. Первинні стадії фотосинтезу рослин під дією чинників довкілля не залишаються незмінними, а активно регулюються клітинами відповідно до їх фізіологічного стану, що призводить до комплексу змін параметрів флуоресценції.

Як тестовий показник для раннього добору стійких форм гіркокаштанів до дії комплексу факторів довкілля рекомендується використовувати коефіцієнт плато $K_{pl} = (F_{pl} - F_0) : (F_{max} - F_0)$. Значення $K_{pl} \geq 0,4-0,5$ свідчить про сприйнятливості генотипів гіркокаштанів до комплексу негативних чинників довкілля, в тому числі і до ураження каштановою міллю. Встановлення взаємозв'язків між станом фотосинтетичного апарату та механізмами стійкості рослин до біотичних чинників сприятиме як розумінню процесів фотосинтезу рослин в природних умовах, так і дозволить з великою інформативністю проводити моніторингові дослідження умов середовища і стану рослин з використанням флуоресцентних методів.

Список літератури

1. Артамонов В. И. Растения и чистота природной среды / В. И. Артамонов. – М.: Наука, 1986. – 172 с.
2. Біологія каштанів / І.П. Григорюк, С.П. Машковська, П. П. Яворовський, О. В. Колесніченко. – К.: Логос, 2004. – 379 с.
3. Взаимодействие растений с техногенно загрязненной средой. Устойчивость. Фитоиндикация. Оптимизация / [И. И. Коршиков, В. С. Котов, И. П. Михеенко и др.]. – К.: Наук. думка, 1995. – 191 с.
4. Войтович І.Д. Інтелектуальні сенсори / І.Д. Войтович, В.М. Корсунський. – К.: Ін-т кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України, 2007. – 514 с.
5. Демчук Т. Л. Система конституціональної стійкості рослин роду *Aesculus* L. до каштанової мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimic) / Т. Л. Демчук, І. П. Григорюк, А. Ф. Ліханов // Доповіді Національної академії наук України. Математика, природознавство, технічні науки: наук.-теоретичний журнал. – 2012. – № 7. – С. 144–152.
6. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою флуоресценції хлорофілу / О.В. Брайон, Д.Ю. Корнеєв, О.О. Снегур, О.І. Китаєв. – К.: Видав.-поліграф. центр «Київський університет», 2000. – 13 с.
7. Корнеєв Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д.Ю. Корнеєв. – К.: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
8. Левон Ф. М. Зелені насадження в антропогенно трансформованому середовищі: монографія / Ф. М. Левон; відп. ред. П. А. Мороз. – К.: ННЦ ІАЕ, 2008. – 364с.
9. Мельничук М. Д. Флуоресцентний аналіз рослин протягом розвитку та в стресових умовах / М. Д. Мельничук, Ю. І. Посудін, О. О. Годлевська // Агробіологія: зб. наук. праць. – Біла Церква, 2009. – Вип. 1 (64). – С. 1–8.
10. Нестеренко Т. В. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям /

Т. В. Нестеренко, А. А. Тихомиров, В. Н. Шихов // Журнал общей биологии. – 2007. – Т. 68, №6. – С. 444–458.

11. Пат. 24908 Україна. Спосіб визначення фізіологічного стану рослин методом індукції флуоресценції хлорофілу / Шерер В. О., Сарахан Є. В.; – заявл. Опубл. 25.07.2007, Бюл. №11.

12. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода / В. С. Лысенко, Т. В. Вардуни, В. Г. Соьер, В. П. Краснов // Фундаментальные исследования. – 2013. – №4. – С. 112–120 с.

13. Холл Д. Фотосинтез / Д. Холл. – М.: Мир, 1983. – 132 с.

14. Lichtenthaler H. K. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions / H. K. Lichtenthaler, U. Rinderle // CRC Crit. Rev. Anal. Chem. – 1988. – V.19, Suppl. 1. – P. 29–85.

15. Rohàček K. Chlorophyll fluorescence parameters; the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationship / K. Rohàček // Photosynthetica. – 2002. – V.40, №1. – P. 13–29.

16. Romanov V. Sherer V., Galelyuka I. et al. Smart portable fluorometer for express-diagnostics of photosynthesis: principles of operation and results of experimental researches // Information research and applications (I.TECH 2007): Firth International Conference, 26-30 June 2007, Varna, Bulgaria : Proceedings. – Vol. 2. – P. 399–403.

Установлена ефективність метода фотоіндукції флуоресценції хлорофилла для определения функціонального стану фотосинтетического апарату каштана конського звичайного і каштана конського червоного в трьох екологічних зонах г. Києва. Обнаружено, что растения исследованных видов в трёх екологічних зонах значительно отличаются по показателям індукційних змін флуоресценції хлорофилла, которые отображают процессы превращения энергии на начальных этапах фотосинтеза. Установлено, что как тестовый показатель для раннего отбора устойчивых форм каштана конського звичайного к влиянию комплекса факторов окружающей среды может использоваться коэффициент плато K_{pl} на кривой Каутского.

A. hippocastanum, A. pavia, физиологическое состояние, хлорофилл, индукция флуоресценции, экспресс-диагностика.

The purpose of the present study was to determine the effectiveness of the chlorophyll fluorescence method induction for the estimation of the functional state of the photosynthetic activity of the horse chestnut and red buckeye in green areas of three ecological zones of Kiev. It was found that the representative plants in three ecological zones have a significant difference of indexes, what shows changes of the induction of chlorophyll fluorescence that reflects the processes of transformation of energy at the early stages of photosynthesis. It was stated that value of K_{pl} plateau in the curve of Kautsky can be used as a test for the early selection of the forms of horse chestnut, resistant to the influence of the complex environmental factors.

A. hippocastanum, A. pavia, general condition, chlorophyll, fluorescence induction, express diagnostics.