

УДК 633.11:57.032

© 2016

*В.М. Стариченко,**Л.М. Голик,**кандидати сільсько-
господарських наук**Національний науковий
центр «Інститут
землеробства НААН»**М.В. Патица,**доктор сільсько-
господарських наук**Національний
університет біоресурсів
і природокористування
України*

ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ ХЛОРОФІЛУ В ЛИСТКАХ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ ОРГАНОГЕНЕЗУ

Мета. Вивчення фізіологічного стану пшениці м'якої озимої на різних етапах органогенезу через визначення вмісту та активності хлорофілу в досліджуваних рослинах і реакції цих сортів на умови перезимівлі. **Методи.** Використано метод фотоіндукції флуоресценції хлорофілу, який дає змогу в польових умовах визначити кількість хлорофілу та інтенсивність фотосинтезу 7-ми сортів пшениці озимої м'якої. **Результати.** Установлено істотну різницю за вмістом та активністю хлорофілу між сортами на різних етапах органогенезу. Показано можливість оцінювання зимостійкості за допомогою методу індукції флуоресценції хлорофілу. **Висновки.** Установлено диференціацію сортів за інтенсивністю фотосинтезу на різних етапах органогенезу. Визначено сорти з підвищеною інтенсивністю фотосинтезу на окремих етапах.

Ключові слова: флуоресценція хлорофілу, фотосинтез, сортова різниця, зимостійкість.

Одним із сучасних та інформативних методів визначення впливу факторів довкілля на фізіологічний стан посівів сільськогосподарських культур є застосування експресного методу фотоіндукції флуоресценції хлорофілу. Оскільки біохімічні реакції зумовлюють фотосинтез та флуоресценцію хлорофілу і є основними каналами перетворення синтезованої енергії через поглинання світлової енергії і передавання її до реакційних центрів фотосинтезу, оперативна діагностика фізіологічного стану рослин дає можливість отримати важливу інформацію про стан фотосинтетичного апарату рослин [1].

Принцип, що лежить в основі аналізу флуоресценції хлорофілу, є відносно простим. Світлова енергія, яка поглинається молекулами хлорофілу в листках, може пройти один із 3-х напрямів: бути використаною для фотосинтезу (фотохімії), надлишкова енергія може розсіюватися у вигляді тепла або повторно випромінюватися у вигляді флуоресценції хлорофілу. Ці 3 процеси відбуваються в конкуренції, будь-яке збільшення ефективності одного

призводить до зниження виходу 2-х інших. Отже, вимірюванням виходу флуоресценції хлорофілу можна отримати інформацію про зміни в ефективності фотохімії та розсіюванні тепла. Хоча загальна кількість флуоресценції хлорофілу дуже мала (лише 1–2% від загального поглиненого світла), виміряти її досить легко. Спектр флуоресценції відрізняється від спектра поглиненого світла, максимальна кількість випромінюваного світла має більшу довжину хвилі, ніж поглиненого. Вихід флуоресценції може бути кількісно визначений через освітлення листка світлом певної довжини хвилі і вимірювання кількості відбитого світла [2–4].

У більшості наукових досліджень для вимірювання параметрів фотосинтезу рослин використовують показник швидкої флуоресценції, тобто вимірювання енергії, яка не вступила в реакцію фотосинтезу і не перейшла в тепло після поглинання клітиною кванта світла [5]. Залежність флуоресценції від часу, що минув після початку освітлення, називають кривою індукції флуоресценції хлорофілу

(ІФХ), або індукційною кривою [6, 7].

Фотосинтез — це процес, який забезпечує клітину енергією, тому збереження фотосинтетичної активності в умовах фізіологічного стресу в багатьох випадках визначає стійкість рослин до несприятливих чинників навколишнього середовища. Основна увага дослідників була спрямована на вивчення реакції рослин на різноманітні стресотворювальні чинники [8–10], тоді як перспективним є вивчення сортової різниці за цим показником з метою використання в селекції. На пшениці м'якій цей метод використовували для оцінювання посухостійкості та жаростійкості зразків [12].

Мета досліджень — вивчення фізіологічного стану пшениці м'якої озимої на різних етапах органогенезу через визначення вмісту хлорофілу в досліджуваних рослинах 6-ти сортів і реакції цих сортів на умови перезимівлі.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили впродовж вегетаційного періоду 2014–2015 рр. у польових умовах у селекційній сівозміні ДПДГ «Чабани» Києво-Святошинського р-ну Київської обл. Предметом досліджень були спектри відбиття флуоресценції хлорофілу сортів пшениці озимої Миронівська 808, Перлина Лісостепу, Поліська 90, Аналог, Столична, Артеміда, Бенефіс. Для вимірювання використовували по 10 рослин із 3-х рендомізовано розміщених ділянок кожного сорту. Вимірювання здійснювали у фазах кушіння (III декада березня), початку трубкування (III декада квітня) та цвітіння (кінець травня).

Стан фотосинтетичного апарату рослин вивчали, використовуючи метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) у листках, для цього вимірювали спектри відбиття і поглинання світла листками. Результати отримували у вигляді кривої Каутського, яка відображає часову залежність інтенсивності флуоресценції хлорофілу. Форма цієї кривої досить чутлива до змін, що відбуваються у фотосинтетичному апараті рослин під час адаптації до різних умов навколишнього середовища [1, 2]. Суть методу полягає в тому, що рослину тримають у темноті, а потім на деякий час освітлюють. Хлорофіл, який міститься в хлоропластах листків, починає світитися (флуоресціювати). Сила світіння спочатку швидко зростає, досягає максимуму, а потім знижується за досить складною траєкторією, поки не досягне деякого стаціонарного рівня. Графік змін флуоресценції від початку освітлення до досягнення стаціонарного

рівня (крива ІФХ) містить інформацію про стан фотосинтезувального апарату. З практичною метою використовують кілька стандартних кількісних показників, які вираховують на основі цього графіка [8].

Визначення проводили за допомогою однопроменевого флуорометра «Флоратест» за 3-хвилинного режиму. Фізіологічно значущі дані отримували на основі аналізу таких кінетичних параметрів, як фонові, або мінімальна флуоресценція (F_0), плато (F_p, F_{pl}), максимальна (F_m) та стаціонарна флуоресценції (F_s, F_t, F_{st}) [1, 2, 10–12]. Для розрахунків консенсусним позначенням стаціонарної флуоресценції взяли F_s , оскільки саме в такому вигляді позначення найчастіше трапляється в літературі, опублікованій за використанням кирилиці. У літературі на латиниці консенсусним вважається позначення F_t [2]. Обчислювали параметри $F_v = F_m - F_0$ (варіабельна флуоресценція) [11] та індекс життєздатності $RF_d = F_d / F_s = (F_m - F_s) / F_s$ [8, 13]. Найкориснішим є параметр, який вимірює ефективність фотосистеми II фотохімії, Φ_{PSII} , що розраховується як: $\Phi_{PSII} = (F_m - F_t) / F_m$. Цей параметр вимірює частку світла, поглиненого хлорофілом, пов'язаним з PSII (фотосистемою II). Він може дати міру швидкості лінійного транспорту електронів і відповідно значення загального фотосинтезу [2]. Згідно з «Настановою з експлуатації» використовованого флуорометра [11] цей показник позначається K_2 — коефіцієнт індукції флуоресценції. У лабораторних умовах є сильна лінійна залежність між цим параметром та ефективністю фіксації вуглецю. Оскільки Φ_{PSII} є квантовим виходом ФС II фотохімії, вона може бути використана для розрахунку лінійної швидкості перенесення електронів і загальної здатності до фотосинтезу в природних умовах [2].

Іншим широко використовуваним параметром флуоресценції є «фотохімічне гасіння», QP. Воно розраховується як: $QP = (F_m - F_t) / (F_m - F_0)$, що дає уявлення про співвідношення реакційних центрів ФС II, які є відкритими. Φ_{PSII} і QP можуть бути пов'язані між собою за допомогою 3-го параметра $-F_v / F_m$. Це є мірою внутрішньої (або максимальної) ефективності PSII (тобто квантова ефективність, якщо всі PSII центри були відкриті). F_v / F_m задається рівнянням: $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m = \Phi_{PSII} / QP$. Отже, водночас, як Φ_{PSII} характеризується досягнутою ефективністю, QP і F_v / F_m надає інформацію про процеси, що лежать в основі зміни ефективності фотосинтезу. Зміна QP відбувається

1. Параметри флуоресценції хлорофілу в листках пшениці м'якої озимої у фазі куцїння

Сорт	Показник відносних одиниць					Індекс			
	F _o	F _p	F _m	F _s	F _v	RF _d	Ф _{PSII}	QP	F _v /F _m
Миронівська 808, St	602,7	1290,7	1418,7	752,0	816,0	0,89	0,47	0,82	0,58
Перлина Лісостепу	570,7	1114,7	1162,7	672,0	592,0	0,73	0,42	0,83	0,51
Поліська 90	592,0	1104,0	1216,0	709,3	624,0	0,71	0,42	0,81	0,51
Аналог	656,0	1304,0	1320,0	776,0	664,0	0,70	0,41	0,82	0,50
Столична	592,0	952,0	952,0	688,0	360,0	0,38	0,28	0,73	0,38
Артемїда	581,3	1162,7	1200,0	720,0	618,7	0,67	0,40	0,78	0,52
Бенефіс	648,0	1408,0	1496,0	776,0	848,0	0,93	0,48	0,85	0,57

через закриття реакційних центрів унаслідок насичення фотосинтезу світлом. Зміна F_v/F_m зумовлена зміною ефективності нефотохімічного гасіння. Значення F_v/F_m відображають потенційну квантову ефективність PSII і використовуються як чутливий індикатор продуктивності фотосинтетичного апарату рослин з оптимальними значеннями близько 0,83, вимірними для більшості видів рослин [2].

Результати досліджень. Вимірювання флуоресценції хлорофілу в листках у фазі куцїння пшениці озимої (III декада березня) показало, що за всіма основними показниками краще себе зарекомендували сорти пшениці озимої Бенефіс і Миронівська 808 (табл. 1). Параметри максимальної флуоресценції F_m , індексу життєздатності RF_d , загального фотосинтезу Φ_{PSII} , фотохімічного гасіння QP були найвищими в сорту Бенефіс і становили 1496 відносних одиниць, відповідно 0,93, 0,48 та 0,85, проте індекс потенційної ефективності фотосинтезу F_v/F_m був найвищим у сорту Миронівська 808 і становив 0,57.

Крива флуоресценції сорту Столична показує, що цей сорт на момент вимірювання був у пригніченому стані, про що свідчить і низький коефіцієнт життєздатності $RF_d=0,38$. Сорти з найвищою кількістю та активністю

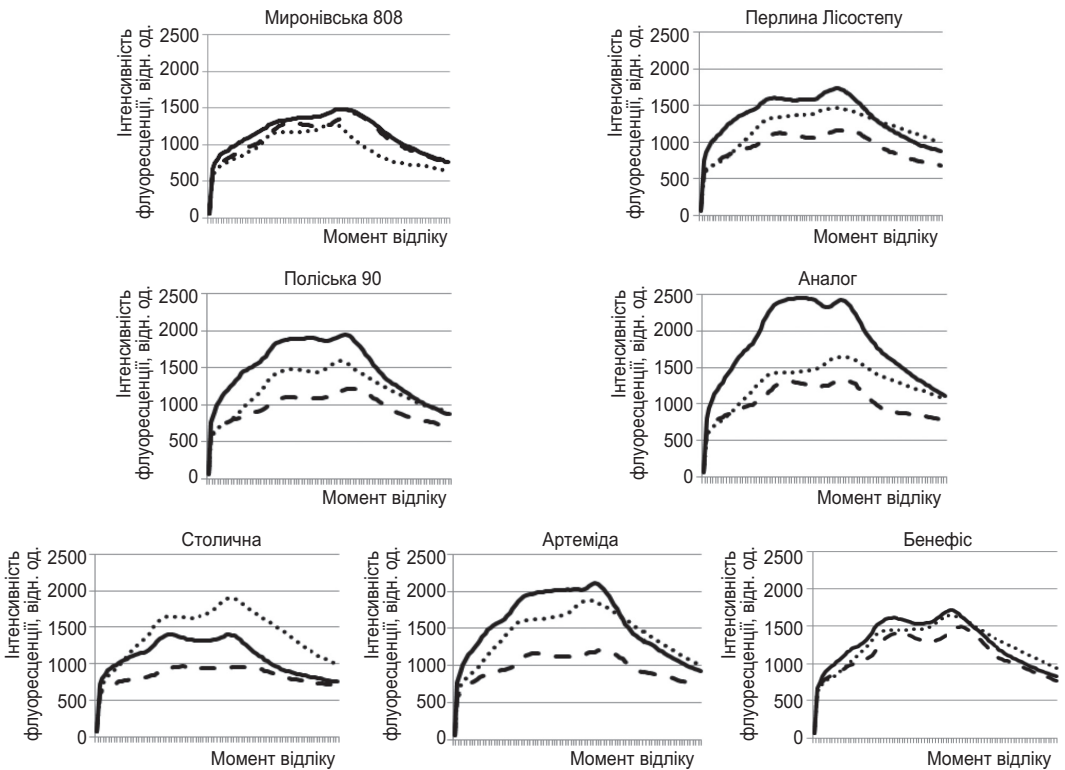
хлорофілу Бенефіс та Миронівська 808 на зазначену дату мають високу зимостійкість, сорт Миронівська 808 є стандартом за зимостійкістю. Криві індукованої флуоресценції хлорофілу, отримані у фазі цвітіння (III декада травня), мали подібну форму до кривих, отриманих раніше, з чітко вираженими моментами F_p та F_m . Відзначено, що інтенсивність фотосинтезу сорту Миронівська 808 значно знизилася, F_m становить менше 1000 відносних одиниць. Слід зазначити, що цей сорт належить до попередньої сортозміни і відповідно має нижчу врожайність порівняно з іншими представленими сортами. Ймовірно, що низька інтенсивність фотосинтезу в період цвітіння є однією з причин нижчої врожайності.

Найвищі уміст хлорофілу та інтенсивність фотосинтезу в цей період спостерігалися в сортів Столична та Артемїда, дещо гірші — у сортів Бенефіс та Поліська 90, про що свідчить високий показник F_m та високі індекси життєздатності і загального ефективного фотосинтезу (табл. 2). Найнижчий індекс життєздатності в цей період відзначено в сортів Перлина Лісостепу та Аналог, а найнижчий індекс продуктивності фотосинтетичного апарату F_v/F_m — у сорту Миронівська 808.

На рисунку наведено криві Каутського для

2. Параметри флуоресценції хлорофілу в листках пшениці м'якої озимої у фазі цвітіння

Сорт	Показник відносних одиниць					Індекс			
	F _o	F _p	F _m	F _s	F _v	RF _d	Ф _{PSII}	QP	F _v /F _m
Миронівська 808, St	528,0	938,7	986,7	618,7	458,7	0,59	0,37	0,80	0,46
Перлина Лісостепу	560,0	1350,0	1454,0	976,0	894,0	0,49	0,33	0,53	0,61
Поліська 90	560,0	1477,0	1584,0	901,3	1024,0	0,76	0,43	0,67	0,65
Аналог	565,0	1472,0	1637,0	1056,0	1072,0	0,55	0,35	0,54	0,65
Столична	632,0	1440,0	1909,0	992,0	1277,0	0,92	0,48	0,72	0,67
Артемїда	629,0	1648,0	1866,7	992,0	1237,7	0,88	0,47	0,71	0,66
Бенефіс	613,0	1145,3	1637,3	944,0	1024,3	0,73	0,42	0,68	0,63



Флуоресценція хлорофілу у фазах: --- — кущіння; — — трубкування; — цвітіння

кожного з досліджуваних сортів на 3-х етапах органогенезу. Оскільки вимірювання проводили одночасно на всіх сортах, які належать до різних груп стиглості, етапи розвитку окремих сортів можуть бути дещо зміщені. Показано, що максимальні кількість хлорофілу в листках та інтенсивність фотосинтезу в більшості сортів спостерігалися у фазах трубкування, дещо нижчі — цвітіння та мінімальні — кущіння.

У сорту Столична найвищу інтенсивність фотосинтезу відзначено у фазі цвітіння. Скоростиглий сорт Аналог мав найвищу інтенсивність фотосинтезу порівняно з іншими сортами за вимірювання в III декаду квітня у фазі трубкування, що пов'язано з його прискореним розвитком у цей період. Високоврожайні сорти Столична та Артеміда мали підвищену інтенсивність фотосинтезу під час цвітіння. Сорти Бенефіс та Миронівська 808

3. Кореляційні зв'язки між параметрами та індексами флуоресценції хлорофілу на різних фазах органогенезу

Параметр	F _o	F _p	F _m	F _s	F _v	RF _d	Φ _{PSII}	QP	F _v /F _m
F _o	—	0,74	0,63	0,89	0,49	0,37	0,34	0,43	0,28
F _p	0,51	—	0,76	0,89	0,93	0,87	0,85	0,79	0,83
F _m	0,88	0,81	—	0,83	0,99	0,95	0,93	0,83	0,91
F _s	0,60	0,79	0,85	—	0,74	0,60	0,58	0,49	0,49
F _v	0,84	0,84	1,00	0,87	—	0,98	0,96	0,83	0,96
RF _d	0,80	0,42	0,68	0,20	0,65	—	0,99	0,90	0,98
Φ _{PSII}	0,78	0,39	0,66	0,17	0,63	1,00	—	0,91	0,84
QP	0,11	-0,41	-0,24	-0,70	-0,28	0,54	0,56	—	0,84
F _v /F _m	0,69	0,86	0,94	0,94	0,96	0,46	-0,50	-0,50	—

характеризувалися найбільш вирівняними за етапами органогенезу кривими Каутського. Зроблено припущення, що поєднання в одному генотипі високої інтенсивності фотосинтезу на всіх етапах органогенезу методом схрещування відповідних батьківських пар і подальшого селекційного добору дасть змогу отримати зразки з підвищеною продуктивністю фотосинтетичного апарату.

Оскільки є кілька параметрів, які розраховують на основі кривої флуоресценції хлорофілу, то було досліджено кореляційні зв'язки

між ними з метою визначення доцільності обчислення кожного з них. Результати наведено в табл. 3, де в її правій частині показано коефіцієнти кореляції між параметрами, отриманими у фазі куціння пшениці озимої, у лівій частині — у фазі цвітіння. У фазі куціння зв'язок між усіма обчисленими індексами був досить тісним, проте у фазі цвітіння лише індекси RF_d та F_{PSII} показали тісну залежність ($r=0,99$). Оскільки ці параметри дублюють один одного, під час проведення досліджень можна знехтувати одним із них.

Висновки

Установлено диференціацію сортів за інтенсивністю фотосинтезу на різних етапах органогенезу. Визначено сорти з підвищеною інтенсивністю фотосинтезу на окремих етапах.

За результатами індукції флуоресценції хлорофілу в листках, після перезимівлі краще себе зарекомендували сорти пшениці озимої Бенедіс і стандарт Миронівська 808 з високою зимостійкістю. У III декаді квітня на початку виходу рослин у трубку

найвища інтенсивність фотосинтезу була в ранньостиглого сорту Аналог. У фазі цвітіння найінтенсивніший фотосинтез спостерігався у сортів Столична та Перлина Лісостепу, які мають найвищу потенційну продуктивність за елементами структури колоса серед досліджуваних зразків. Зроблено припущення про можливість поєднання в одному генотипі високої інтенсивності фотосинтезу на всіх етапах органогенезу.

Бібліографія

1. Патица М.В. Моніторинг ростових процесів рослин в агрофітоценозах експрес-методом індукції флуоресценції хлорофілу/М.В. Патица, В.В. Груша, Т.І. Гордієнко//36. наук. пр. ННЦ «Інститут землеробства НААН». — К., 2014. — Вип. 3. — С. 49–55.
2. Maxwell K. Chlorophyll fluorescence — a practical guide/K. Maxwell, G.N. Johnson//J. of experimental botany. — 2000. —V. 51. —Is. 345. —P. 659–668.
3. Сімейство портативних приладів «Флоратест»: підготовка до серійного виробництва/В.О. Романов, Д.М. Артеменко, Ю.О. Брайко та ін.//Комп'ютерні засоби, мережі та системи. — 2011. — № 10. — С. 85–93.
4. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла/Д.Ю. Корнеев. — К.: Альтерпрес, 2002. — 188 с.
5. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге/А.Б. Рубин//Соросовский образовательный журн. — 2000. —V. 6, № 4. — С. 7–13.
6. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу. Методичні вказівки для студентів біологічного факультету/О.В. Брайон, Д.Ю. Корнеев, О.О. Снегур, О.І. Китаєв. — К.: Видавн.-поліграф. центр Київського ун-ту, 2000. — 15 с.
7. Медведев С.С. Физиология растений/С.С. Медведев. — СПб: Изд-во СПб ун-та, 2004. — 367 с.

8. Нестеренко Т.В. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям/Т.В. Нестеренко, А.А. Тихомиров, В.Н. Шихов//Журн. общей биологии. —2007. —№ 6. Т. 68. — С.444–458.
9. Особливості індукції флуоресценції хлорофілу в листках деревних рослин в умовах урбанізованого середовища/Н.О. Олексійченко, О.І. Китаєв, М.О. Совакова та ін.//Біоресурси і природокористування. — 2013. — № 5–6. — Вип. 5. — С. 107–112.
10. Сарахан Є.В. Особливості практичного застосування портативних біосенсорних приладів сімейства «Флоратест»/Є.В. Сарахан//Комп'ютерні засоби, мережі та системи. — 2011. — № 10. — С. 94–103.
11. Портативний флуорометр «Флоратест» (настанова з експлуатації)/Інститут кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України. — 2011. — 27 с.
12. Sayed O.H. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research/O.H. Sayed//Photosynthetica. —2003. —41 (3). —P. 321–330.
13. Застосування портативного флуориметра для оцінювання резистентності рослин до біотичних факторів/О.О. Годлевська, І.А. Залоїло, Я.В. Кожем'яко, Ю.І. Посудін//Наук. вісн. НУБіП України. — 2011. — Вип. 161. — С. 217–225.

Надійшла 20.04.2016.