

УДК: 633.16: 57.032

М.В. Патика, доктор сільськогосподарських наук

В.В. Груша, кандидат біологічних наук

Т.І. Гордієнко, кандидат сільськогосподарських наук

ННЦ «ІНСТИТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА НААН»

МОНІТОРИНГ РОСТОВИХ ПРОЦЕСІВ РОСЛИН В АГРОФІТОЦЕНОЗАХ ЕКСПРЕС-МЕТОДОМ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ

Дослідження параметрів флуоресценції хлорофілу є потужним інструментом вивчення впливу різноманітних екологічних, антропогенних факторів на рослинні організми. Хімічні фактори і кліматичні умови, часто будучи інгібіторами і активаторами біоенергетичних процесів, що протікають в тилакоїдах рослинних клітин, здатні надавати виражений вплив на параметри кінетики та спектральні особливості флуоресценції, а також на її стаціонарний рівень. Вивчення кінетики флуоресценції може дати важливу інформацію щодо характеру активності чинників навколишнього природного середовища на параметри фотосинтезу – використані з метою екологічного моніторингу, а також із метою оцінювання стійкості рослин в процесі росту і розвитку.

Дослідження впливу різних чинників зовнішнього середовища на рослини у процесі їх онтогенезу вимагає застосування експресних та інформативних методів, які дають змогу здійснювати аналізи як у лабораторних, так і в польових умовах, не порушуючи цілісності досліджуваних рослин. До таких методів належить метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), який широко використовується в сучасних дослідженнях фотосинтетичних процесів. Визначення індукції флуоресценції хлорофілу рослинних об'єктів є дієвим методом визначення фізіологічного стану рослин в агрофітоценозах [2].

Здатність рослин успішно виконувати фотосинтез залежить від різних чинників природного навколишнього середовища, включаючи стресові. Поглинута світлова енергія, яка використовується для фотосинтезу, розсіюється через виділення тепла у вигляді світлових хвиль червоного та інфрачервоного діапазонів. Випромінювання флуоресценції хлорофілу вегетуючим листком є незначним і не може спостерігатися неозброєним оком, але його можна зафіксувати спеціальними пристроями, такими як флуорометри [11].

© Патика М.В., Груша В.В., Гордієнко Т.І., 2014

Фотосинтез та індукція флуоресценції хлорофілу відбуваються в прямій конкуренції між собою і обмежені кількістю поглинутої світлової енергії. Будь-які зміни у використанні енергії одним із цих процесів зумовлює додаткові зміни в іншому процесі. Це дозволяє використовувати індукцію флуоресценції хлорофілу як експресне та надійне оцінювання фотосинтезу. Флуорометри призначені спеціально для виявлення випромінювання флуоресценції хлорофілу на листках рослин [4].

У більшості наукових досліджень для вимірювання параметрів фотосинтетичного апарату рослин використовується показник швидкої флуоресценції, тобто вимірювання енергії, яка не вступала в реакцію фотосинтезу і не перейшла в тепло після поглинання клітиною кванта світла [10]. Залежність флуоресценції від часу після початку освітлення називають кривою індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) або індукційною кривою [1, 5].

Наукові дослідження вітчизняних та іноземних вчених свідчать про можливість використовувати цей ефект для експресного оцінювання життєдіяльності рослин, що знаходяться під впливом біотичних та абіотичних чинників – посуха, заморозки, внесення пестицидів, визначення оптимальних доз мінеральних добрив, забруднення довкілля шкідливими речовинами техногенного походження. Як результат, це дає можливість автоматизувати дослідження в галузі рослинництва, визначати оптимальні дози мікроелементів, мінеральних добрив, стимуляторів росту тощо [3, 12, 13, 15].

Метою досліджень було визначення фізіологічного стану ячменю ярого та встановлення рівня активізації фізіологічних процесів у рослинах під впливом фактора ризосфери, обумовленого формуванням рослинно-мікробної взаємодії.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили у модельних та вегетаційних дослідах на торфосумішах з $\text{pH}_{(\text{KCl})}$ 6,3. Повторність дослідів трьохкратна. Для вивчення функціональних характеристик фотосинтетичного апарату рослин ячменю ярого (сорт Незабудка) використовували метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) – реєстрацію флуоресценції хлорофілу листків, кінетика якої має характерний вигляд кривої (крива Каутського) і відображає параметри первинних процесів фотосинтезу, що змінюються залежно від умов вирощування рослин. Невикористана у фотосинтезі енергія поглинутих квантів світла переходить або в тепло, або у флуоресценцію хлорофілу. Параметри флуоресценції є показником стану та ефективності протікання процесів фотосинтезу, оскільки зменшен-

ня ефективності використання світлової енергії у фотосинтезі веде до збільшення інтенсивності флуоресценції [6, 9]. Визначення проводили за допомогою однопроменевого флуорометру «Флоратест» за трихвилинного режиму. Фізіологічно значимі дані отримують на основі аналізу таких кінетичних параметрів, як фонові флуоресценція (F_0), максимальна флуоресценція (F_m) і стаціонарна флуоресценція (F_s) [12, 14].

Результати досліджень та їх обговорення. У модельному вегетаційному досліді було досліджено стан рослин ячменю ярого сорту Незабудка в стресових умовах при вирощуванні рослин на токсичних торфосумішах і при застосуванні мультифункціонального мікробного біологічного препарату Екстракон (розробник – ННЦ «Інститут землеробства НААН»), основу якого складає природний консорціум ґрунтових мікроорганізмів, призначений для трансформації будь-яких органічних речовин в біогумус (наприклад, соломи, листового опаду, рослинних решток, гілок, кори, складних лігнін-целюлоз, целюлоз і геміцелюлоз, побутових целюлозовмісних відходів, паперу, картону та ін.), а також торфи верхового і перехідного типу. За наявності вуглецьвмісних кореневих ексудатів Екстракон формує специфічну рослинно-мікробну систему [7, 8].

Спостереження проводили на вегетуючих листках рослин після їх адаптації до темряви. Після початку дії світла інтенсивність флуоресценції хлорофілу (індукція флуоресценції або флуоресценція, індукована (наведена) світлом) починає істотно змінюватись з часом. Часова залежність інтенсивності флуоресценції хлорофілу (ІФХ) має характерний вигляд кривої з кількома максимумами та називається крива Індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) або крива Каутського (рис. 1). Форма цієї кривої досить чутлива до змін, які відбуваються у фотосинтетичному апараті рослин при адаптації до різних умов навколишнього середовища. У початковий момент часу всі канали фотосинтетичного переносу електронів відкриті і максимум енергії збуджених електронів йде на фотосинтетичний процес. У цей період флуоресценція хлорофілу мінімальна (F_0) і різниці у варіантах не спостерігається. Перехід від F_0 до F_r зумовлений переносом електронів від реакційних центрів ФС II до первинних акцепторів (хінонів), у варіанті із застосуванням біологічного препарату Екстракон, і у варіанті з додаванням 10% від загального об'єму торфу з високою чисельністю мікроміцетів (токсичного для рослин), спостерігали відхилення кривих ІФХ від контролю у бік зростання. Відрізок кривої від F_0 до F_m (швидка фаза флуоресценції

або варіабельна флуоресценція), при якій відбувається активація (через феродоксин) білків-ферментів циклу Кальвіна, встановлення градієнту рН у мембранах та відновлення конкуруючих акцепторів (O_2 , NO_2), ці фізіологічні процеси проходять на 20% інтенсивніше у варіантах із застосуванням мультифункціонального препарату Екстракон порівняно до контролю, а у варіанті із застосуванням токсичного торфу вони сповільнюються у 77% порівняно до контролю (рис. 1.). Після досягнення піку F_m йде спадання й вихід на стаціонарний режим – це повільна фаза ІФХ, при якій відбувається налагодження реакцій циклу Кальвіна й потоків речовин через мембрани та по судинах листків. Застосування біологічного препарату Екстракон у варіанті торф токсичний (висока чисельність міксоміцетів) сприяє його «оздоровленню», оскільки ґрунтові мікробні мікроорганізми біопрепарату переходять у ризосферу і починають ефективно взаємодіяти з рослиним організмом, а також створюють оптимальні умови для їх вегетації.

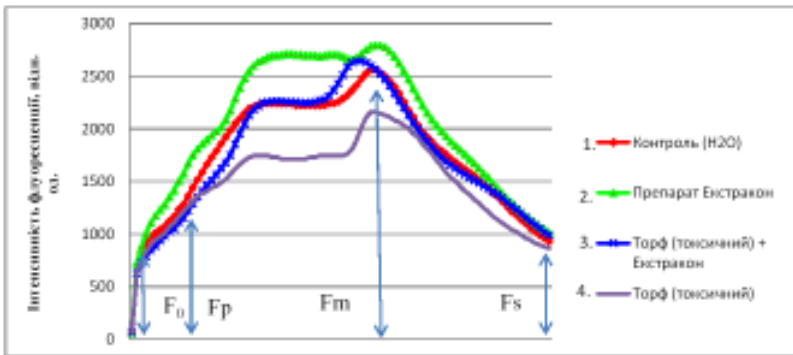


Рис. 1. Криві Каутського контрольних рослин ячменю ярого та варіантів дослідю.

Варіанти дослідю: 1. – контроль (H_2O); 2. – біологічний препарат Екстракон; 3. – Торф із високою чисельністю мікроміцетів (токсичний для рослин) та додаванням 10% біологічного препарату Екстракон; 4. – Торф із високою чисельністю мікроміцетів (токсичний для рослин).

Як видно на рис. 1, певні відрізки кривої індукції флуоресценції хлорофілу є індикаторами відповідних фізіологічних процесів у ланцюгу фотосинтезу. Тому порушення окремих ланок фотосинтезу, які

викликані екзо- та ендегенними чинниками, проявляються у характерних змінах відповідних відрізків кривої ІФХ. Такі зміни кривої ІФХ дослідної рослини, на яку діє збуджуючий чинник, у порівнянні з кривою ІФХ контрольної рослини, на яку чинник не діє, свідчать про вплив чинника.

Тому за допомогою методу індукції флуоресценції хлорофілу можна визначити токсичність ґрунтосуміші, що заселені високою чисельністю міксоміцетів, а також моніторити території забруднені пестицидами, важкими металами, нафтопродуктами тощо.

Особливо важливим є те, що зміни фотосинтезу за допомогою методу ІФХ можна виявити задовго до того, як зміниться зовнішній вигляд рослини та попередити за допомогою відповідних агротехнічних заходів. Крім цього, можна ще на ранній стадії онтогенезу детектувати моменти формування взаємодії з ризосферною мікрофлорою та створення фактору ризосфери, а за погіршення стану навколишнього середовища своєчасно застосувати відповідні заходи (підживлення мікро- і макроелементами, інтегрований захист рослин, зрошування тощо). Крім цього, виявляючи зміни у фотосинтезі культурних рослин, метод ІФХ дозволяє контролювати стан та вплив екзогенних та ендегенних факторів довкілля, виявляти порушення гомеостазу агроecosystem.

Висновки. Отже, одним із сучасних та інформативних методів визначення впливу факторів довкілля, а також фізіологічного стану посівів сільськогосподарських культур є застосування експресного методу фотоіндукції флуоресценції хлорофілу. В силу того, що біохімічні реакції обумовлюють фотосинтез і флуоресценцію хлорофілу та є основними каналами перетворення синтезованої шляхом поглинання світлової енергії і передачі її до реакційних центрів фотосинтезу, оперативна діагностика фізіологічного стану рослин дає можливість отримати важливу інформацію про стан фотосинтетичного апарату рослин. Якщо за будь-яких чинників фотосинтез гальмується, це в першу чергу позначається на інтенсивності флуоресценції хлорофілу. За рівнем виявлених змін визначено, що саме ланкою фактору ризосфери обумовлено процес фотосинтезу.

Доведена необхідність формування відповідних умов для вегетації рослин за участю біологічної складової в ризосфері, а також створення трофічних систем між рослиною (продукування ексудатів вуглецевмісних фотосинтетично асимільованих, які створюють умови або середовище для ґрунтової мікрофлори). Ґрунтова мікрофлора селективно стає ризосферною, але не завжди. В цьому аспекті вико-

ристання біопрепарату Екстракон на основі консорціуму ґрунтових мікроорганізмів сприяє оптимальним умовам вегетації рослин, оскільки мікробні складові біопрепарату переходять у ризосферу і починають ефективно взаємодіяти з рослиною.

1. Брайон О.В. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флюоресценції хлорофілу. Методичні вказівки для студентів біологічного факультету / О.В. Брайон, Д.Ю. Корнеєв, О.О. Снегур, О.І. Китаєв. – К.: Видавничо-поліграфічний центр Київського університету, 2000. – 15 с.
2. Брайон О.В. Флуоресцентна мікроскопія рослинних тканин і клітин. / О.В. Брайон – К.: Вища школа, 1973. – 144 с.
3. Китаєв О.И. Флуоресцентные микроспектральные исследования физиологических особенностей плодовых и ягодных растений в связи с их зимостойкостью: диссерт. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. / О.И. Китаєв. – К. – 1985. – 155 с.
4. Корнеєв Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д.Ю. Корнеєв. – К.: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
5. Медведев С.С. Физиология растений / С.С. Медведев. – Санкт-Петербург: Изд-во С.-Пет. Ун-та, 2004. – 367 с.
6. Основы флуоресцентной спектроскопии / Д. Лакович. – Пер. с англ. – М: Мир, 1986. – 496 с.
7. Петриченко В.Ф. Землеробство з основами екології, ґрунтознавства та агрохімії / В.Ф. Петриченко, М.Я. Бомба, М.В. Патица [та ін.]. – К.: Аграрна наука, 2011. – 492 с.
8. Патыка Н.В. Микроорганизмы почвы: структура и функциональное разнообразие / Н.В. Патыка, Ю.В. Круглов, Е.В. Шеин // Агрехімія і ґрунтознавство. Охорона ґрунтів – основа сталого розвитку України. – Кн. 3. – Харків, 2014. – 312 с.
9. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга / А.Б. Рубин. Технология живых систем. – Т.2. – 2005. – С. 47-68.
10. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // А.Б. Рубин. Соросовский образовательный журнал. – 2000. – 6, № 4. – С. 7-13.
11. 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.
12. Butler W.L. Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer. – In: Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 5. / ed. by Trebst A., Avron M. – Springer. – Berlin, 1977. – P. 149-167
13. Muller N.J.C. Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll des lebenden Blattes // Jahrbucher Wissenschaftliche Botanik. – 1874. – Vol. 9. – P. 42-49.

14. Nobel P.S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology (Fourth Edition)*. – Academic Press. – New York, 2009.

15. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. *Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient*. – In: *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis / ed. by Papageorgiou G.C., Govindjee*. – Springer. – The Netherlands, Dordrecht, 2004. – P. 322-362

Встановлено, що інтенсивність флуоресценції хлорофілу дає важливу інформацію про стан фотосинтетичного апарату сільськогосподарських рослин. Якщо фотосинтез гальмується, пригнічується стресовими факторами, то зростає інтенсивність флуоресценції хлорофілу. По розташуванню виявлених змін на кривій індукції флуоресценції хлорофілу можна визначити, якою саме ланкою багатofакторного процесу фотосинтезу обумовлені ці зміни.

Ключові слова: фотосинтез, метод індукції флуоресценції хлорофілу, флуорометр «Флоратест», крива індукції флуоресценції хлорофілу, ризосфера.

Установлено, что интенсивность флуоресценции хлорофилла дает важную информацию о состоянии фотосинтетического аппарата растений. Если фотосинтез замедляется, угнетается под действием стрессового фактора, то повышается интенсивность флуоресценции хлорофилла. По распределению выявленных изменений на «кривой индукции флуоресценции хлорофилла» можно определить, на каком именно звене многофакторного процесса фотосинтеза получены эти изменения.

Ключевые слова: фотосинтез, метод индукции флуоресценции хлорофилла, флуорометр «Флоратест», кривая индукции флуоресценции хлорофилла, ризосфера.

It was demonstrated that watching the intensity of chlorophyll fluorescence gives important information about the state of the photosynthetic apparatus of plants. If photosynthesis slows down, inhibits by the action of some stress-factor, then increases the intensity of the fluorescence of chlorophyll. On the distribution of detected changes to «chlorophyll fluorescence induction curve» we can determine exactly the link where the multifactorial process of photosynthesis produced these changes.

Key words: photosynthesis, method of chlorophyll fluorescence induction, fluorometr «Floratest», chlorophyll fluorescence induction curve, rhizosphere.

Рецензенти:

Бойко П.І. — д. с. -г. наук

Мокрієнко В.А. — канд. с. -г. наук

Стаття надійшла до редакції 08.09.2014 р.