

ПОКАЗНИКИ ІНДУКЦІЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ У РОСЛИН *LUPINUS LUTEUS*, ВРАЖЕНИХ КАРБОНАТНИМ ХЛОРОЗОМ ЗА ОБРОБКИ КОЛОЇДНИМИ РОЗЧИНАМИ Zn ТА Fe

М.Ф. Стародуб, доктор біологічних наук

Р.В. Сонько, аспірант *

К.Г. Лопатько, кандидат технічних наук

Національний університет біоресурсів

і природокористування України

В.В. Трач, кандидат біологічних наук

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

*Наведено результати дослідження впливу колоїдних розчинів Fe та Zn, на фотосинтетичну активність рослин *Lupinus luteus* методом оцінки інтенсивності флуоресценції хлорофілу. Показано зміни основних параметрів флуоресценції у здорових рослин та уражених карбонатним хлорозом. При ураженні рослин карбонатним хлорозом відбувається зменшення ефективності роботи фотосистеми II. Обробка рослин колоїдними розчинами металів заліза та цинку сприяє покращенню роботи їх фотосинтетичного апарату.*

Колоїдні розчини, індукція флуоресценції хлорофілу, карбонатний хлороз.

Для швидкої діагностики впливу екстремальних чинників довкілля на рослини розробляють різні методи з відповідним інструментальним забезпеченням. Одним із них є метод, що базується на реєстрації інтенсивності флуоресценції хлорофілу (ІФХ), який дозволяє отримувати інформацію щодо активності фотосинтетичного апарату, а останній, в свою чергу, віддзеркалює загальний стан рослини [11]. Суть його полягає в оцінці окремих характеристик ІФХ, що виникає при освітленні інтенсивним світлом, адаптованого до темряви листа рослини. Світлова енергія поглинута молекулами хлорофілу у листі може використатися для одного із трьох процесів: генерації фотохімічних реакцій, розсіювання енергії у вигляді тепла або випромінювання у вигляді флуоресценції. Ці три процеси є конкурентними, тому зміна ефективності одного з них призводить до варіювання показників для двох інших. Таким чином, визначення особливостей показників (ІФХ), або деталізація характеристики кривої Каутського, дає інформацію про зміни ефективності протікання фотохімічних реакції [4]. Немонотонний характер цієї кривої пов'язаний з кінетичними особливостями первинних процесів фотосинтезу, зі станом світло-збираючого комплексу, реакційного центру (РЦ), акцепторною та донорною частиною фотосистеми II (ФС II), роботою електрон-транспортного ланцюга, сполученням темної і світлової фаз фотосинтезу, а також з альтернативними процесами споживання квантів енергії, інтенсивність якої несе інформацію про коефіцієнт корисної дії фотосистеми [8].

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

Але для ефективного використання цього методу необхідно детальніше вивчити залежності змін параметрів флуоресценції та стану фотосинтетичного апарату рослин за дії різних факторів. Нині це явище уже використовується у науковій практиці при вивченні дії на організм рослин таких факторів як: температура, засуха, мінеральне живлення, гербіциди, а також в разі вибору оптимальної технології вирощування рослин, моніторингу забруднення навколишнього середовища, оцінці вірусних та грибкових інфекцій та в інших випадках [2,10]. Крім того, метод з визначення показників ІФХ дозволяє контролювати стан рослин у реальному часі, що особливо актуально при вивченні механізмів впливу на рослину нових препаратів та нових технологій, до яких належать нанотехнології. Актуальними залишаються питання створення ефективних і екологічно безпечних препаратів, що містять мікроелементи в біологічно доступній формі для використання в умовах, коли виникають функціональні захворювання, які викликані недоступністю мікроелементів. У зв'язку з чим, була вивчена можливість застосування колоїдів металів для поліпшення стану рослин, що вирощуються на карбонатних ґрунтах та в умовах засолення, коли має місце порушення мінерального живлення.

Карбонатний хлороз – це функціональне захворювання, що виникає у рослин на ґрунтах з високим вмістом карбонату кальцію. Хлороз проявляється у пожовтінні листків, що є зовнішньою ознакою різкого зменшення вмісту хлорофілу. Карбонатний хлороз займає особливе місце серед різних типів хлорозу, оскільки він широко розповсюджений на великих площах садів і виноградників, розміщених на карбонатних ґрунтах. Відомо, що карбонатні ґрунти займають 30 % земної поверхні [7]. У процесі хімічних, фізіологічних і агрохімічних досліджень було виявлено, що значна концентрація карбонату кальцію в ґрунті викликає зниження розчинності і доступності для рослин заліза і ряду інших елементів живлення. На цей час можна вважати, що точка зору на карбонатний хлороз як на «залізний» є загальноприйнятою [3,6]. Ці властивості карбонатних ґрунтів створюють своєрідний баланс живлення рослин макро- та особливо мікроелементами, що характеризується недостатнім надходженням деяких металів, які в основному належать до першої перехідної групи. Незбалансованість живлення рослин на карбонатних ґрунтах, відноситься в першу чергу до таких металів як залізо, марганець, кобальт, мідь, цинк. При нестачі будь-якого з цих елементів у рослин проявляються різні захворювання.

Мета досліджень – вивчення ефективності використання колоїдних розчинів *Fe* та/або *Zn* для профілактики та лікування карбонатного хлорозу з аналізом змін у фотосинтетичному апараті рослин методом ІФХ.

Матеріали та методика досліджень. У проведених дослідах тест-культурами виступали рослини люпину жовтого, сорту «Київський ранній», вирощених на нормальних (чорнозем:пісок у співвідношенні 2:1) та карбонатних (чорнозем:пісок 2:1 із вмістом 30 % карбонату кальцію) ґрунтах. Рослини обробляли позакоренево на 14 день росту. Обробку проводили колоїдними розчинами заліза та/або цинку. Оцінку стану фотосинтетичного апарату рослин здійснювали у віці 28 та 36 днів. Облік маси надземної частини рослин і маси коренів, що оброблялись проводили у віці 69 днів (через 6 тижні після однократної обробки). Контролем виступали рослини, вирощені на нормальному ґрунті, який не містив карбонату кальцію. А в разі вивчення

впливу колоїдних розчинів як додатковий контроль були рослини, яких обприскували дистильованою водою та вирощували на обох типах ґрунтів.

Стан фотосинтетичного апарату визначали, оцінюючи інтенсивність ІФХ за допомогою портативного флуорометра «Флоратест», розробленого в Інституті кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України [9]. Вимірювання проводилося на листках середнього ярусу, в режимі 10 с, тобто детектували швидку фазу флуоресценції хлорофілу (ФХ). Для адаптації до умов темряви листя витримували в таких умовах не менше 3 хв. Виміри здійснювали в трикратній повторності.

На кривій ІФХ реєстрували такі показники та параметри [1,2]: F_o – рівень флуоресценції, який випромінюється комплексами ФС II з відкритими реакційними центрами (РЦ), в яких хіноновий акцептор Q_a знаходиться в окисленому стані; F_m – інтенсивність ФХ при «закритих» РЦ ФС II, коли всі Q_a відновлені та не можуть приймати електрони від РЦ. Також для аналізу використовувалися параметри: $F_v = (F_m - F_o)$ – величина варіабельної флуоресценції, що зумовлена частиною світлової енергії, яка в первинних реакціях фотосинтезу утилізується при відкритих РЦ; F_v/F_m – показник, який використовується індикатором потенційної фотосинтетичної активності листка та значення якого залежить від ефективності фотохімічних реакції ФС II.

Статистичну обробку даних здійснювали, використовуючи програму MSExcel. Достовірність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Стюдента при рівні значущості $P < 0.05$.

Результати досліджень. Як показують результати досліджень (рис. 1), ураження рослин карбонатним хлорозом сприяло збільшенню показника F_o , що вказує на збільшення втрат енергії при її міграції по пігментній матриці. Така різниця була виявлена у віці рослин 28 днів, проте вже у віці рослин 36 днів ця тенденція хоча і спостерігалася але вона була статистично недостовірною. Слід зазначити, що на рис. 1 та наступних зірочками позначено статистично вірогідні відмінності, причому збільшення їх кількості вказує на зростання різниці між порівнюваними результатами.



Рис. 1. Вплив колоїдних розчинів металів на показник F_o , у рослин віком 28 (а) та 36 (б) днів, вирощених на нормальних та карбонатних ґрунтах

У результаті обробки рослин колоїдними розчинами металів, інтенсивність фонові флуоресценції (F_o) відрізнялася у рослин різного віку, втім їх характер залишався незмінний за різного складу ґрунту. Так у віці 28

днів (через 2 тижні після однократної обробки) найбільша інтенсивність фонові флуоресценції спостерігалася у варіанті, де для обробки використовувався розчин Fe , тоді як у 36-ти денному віці (через 3 тижні після однократної обробки) цей показник був на рівні контролю. За обробки рослин розчином Zn статистично достовірної різниці порівняно з контролем виявлено не було. Обробка люпину колоїдним розчином $Fe+Zn$, викликала зменшення рівня фонові флуоресценції, що вказує на продуктивнішу роботу антенного хлорофілу при передачі енергії збудження.

Результати визначення рівня максимальної флуоресценції показують, що у рослин віком 28 днів, вирощених на чистих ґрунтах, при дії колоїдних розчинів металів відмічалася незначне збільшення цього показника при використанні розчину Zn , а в разі дії решти розчинів ефект не спостерігався. Рослини, вирощені на карбонатних ґрунтах, виявилися більш чутливими до дій розчинів металів, яка проявлялася у зменшенні значення максимальної флуоресценції. У рослин, вражених карбонатним хлорозом, які не оброблялися колоїдними розчинами, рівень максимальної флуоресценції мав найбільше значення порівняно з іншими рослинами. При проведенні вимірювань ІФХ у рослин у віці 36 днів було відмічено збільшення рівня максимальної флуоресценції контрольних груп, які не оброблялися розчинами металів. У рослин дослідних варіантів (оброблених одним або двома металами) відмічалася зменшення рівня максимальної флуоресценції, що свідчить про більш продуктивну роботу електрон-транспортного ланцюга. Виняток становили рослини, вирощені на чорноземному ґрунті та оброблені розчином заліза, де значення показника F_m , залишалася на рівні контролю (рис. 2).

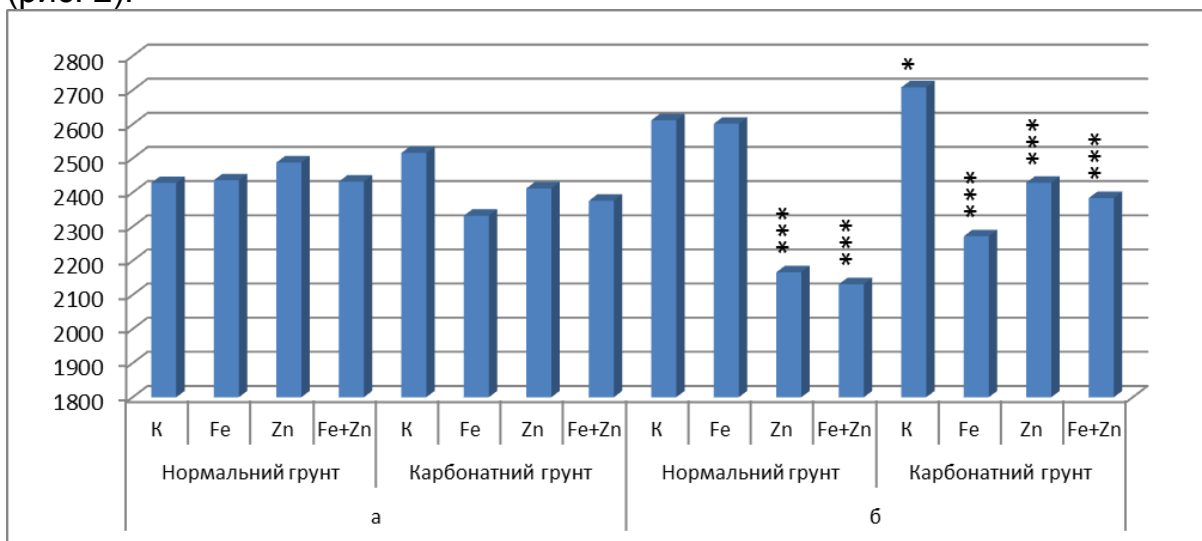


Рис. 2. Вплив колоїдних розчинів металів на показник F_m , у рослин віком 28 (а) та 36 (б) днів, вирощених на нормальних та карбонатних ґрунтах

Досить широкого розповсюдження у практиці флуоресцентної діагностики набув параметр Fv/Fm , значення якого дозволяє характеризувати процеси фотосинтезу в межах цілого організму [5]. Наведені на рис. 3 результати свідчать, що у рослин, які вирощувалися на нормальному ґрунті та оброблялися розчином Fe , зменшувалася фотосинтетична активність, яка з часом поверталася до рівня контролю. У рослин, оброблених розчинами Zn та $Fe+Zn$ (нормальний ґрунт), навпаки активність фотосинтезу була в межах контролю, проте пізніше вона зменшилася майже на половину. У рослин, вирощених на карбонатних ґрунтах, через два тижні після обробки, дія всіх

колоїдних розчинів викликала невелике зменшення фотохімічної активності. Вимірювання показників ІФХ через три тижні після обробки показало, що фотохімічна активність поступово почала збільшуватися.

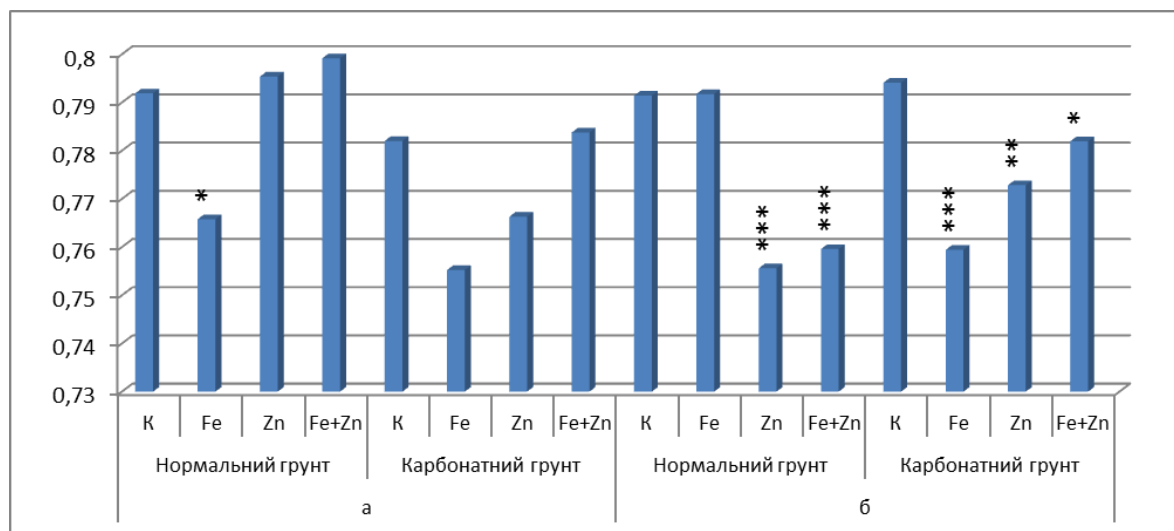


Рис. 3. Вплив колоїдних розчинів металів на показник F_v/F_m , у рослин віком 28 (а) та 36 (б) днів, вирощених на нормальних та карбонатних ґрунтах

У рослин, оброблених розчинами *Zn* та *Fe+Zn* (нормальний ґрунт), навпаки активність фотосинтезу була в межах контролю, проте пізніше вона зменшувалася майже наполовину. При вирощуванні рослин на карбонатних ґрунтах дія всіх колоїдних розчинів через два тижні після обробки викликала невелике зменшення фотохімічної активності. Вимірювання показників ІФХ через три тижні після обробки показувало, що фотохімічна активність поступово почала збільшуватись.

З метою встановлення дії колоїдних розчинів металів на перших етапах було відібрано частину рослин і проведено повторну їх обробку з визначенням інтенсивності ІФХ на наступний день після повторної обробки. Отримані результати, які наведені на рис. 4, показують, що у рослин, не вражених карбонатним хлорозом спостерігається значне зменшення втрат енергії при її міграції по пігментній матриці незалежно від виду розчину, яким проводилась обробка. Тоді, як у рослин, вирощених на карбонатних ґрунтах, такого ефекту не відмічалось. Посилення фотосинтетичної функцій та збільшення рівня максимальної флуоресценції було викликано дією розчинів заліза та цинку незалежно від ґрунту, на якому вони вирощувались. При використанні цих елементів в одному розчині показник F_v/F_m зменшувався на карбонатних та збільшувався на нормальних ґрунтах.

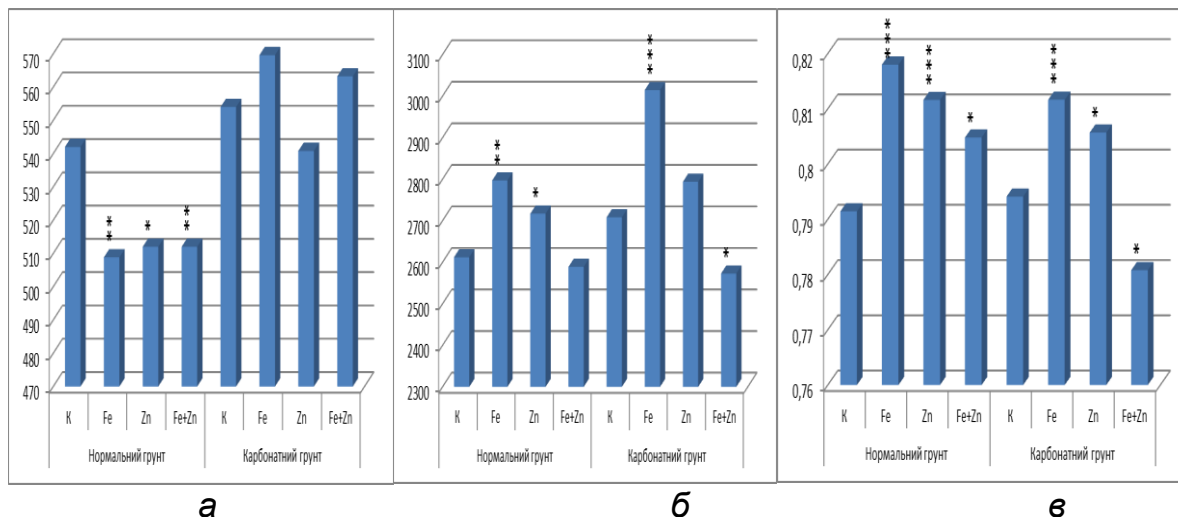


Рис 4. Показники F_o (а), F_m (б) та F_v/F_m (в), у рослин, вирощених на нормальних та карбонатних ґрунтах за повторної обробки

Результати визначення маси надземної частини і маси коренів рослин люпину жовтого, вирощених на звичайному ґрунті і оброблених розчинами металів (Fe, Zn) свідчать про те, що маса надземної частини у варіантах, оброблених колоїдним розчином Fe і колоїдним розчином Zn, збільшилася на 6,3 % і 7,1 %, а у варіанті Fe+Zn – на 32 % порівняно з контрольними показниками. При цьому також відбувся потужний розвиток кореневої системи. Найбільше збільшення маси коренів дала обробка Fe (68 %), трохи менше - сумішшю колоїдних розчинів двох металів Fe і Zn (60 %). Маса коренів у варіанті, де рослини обробили колоїдним розчином Zn, зросла на 25%.

Рослини, вирощувані на карбонатному ґрунті, відставали від контрольних в рості і вазі. Середня маса коренів люпину, що вирощувався на карбонатному ґрунті, була менше маси коренів люпину від контрольного варіанта і становила 1,4 г, а маса надземної частини - 3,5 г (табл.1 і 2).

Результати визначення маси рослин люпину жовтого, вирощених на карбонатному ґрунті та оброблених колоїдними розчинами металів, свідчать про те, що внаслідок обробки і маса надземної частини, і маса коренів так само як і у варіантах із звичайним ґрунтом, збільшилися порівняно з контролем. Однак, на відміну від варіантів із звичайним ґрунтом найбільша надбавка маси була отримана у варіанті, де рослини обробили колоїдним розчином Fe, що додатково свідчить про те, що карбонатний хлороз – в першу чергу хвороба так званої «залізної недостатності». Надбавка маси коренів, після обробки колоїдним розчином Fe становила 50 %, маса надземної частини рослин перевищувала контрольний варіант на 31 %. Обробка рослин сумішшю металів Fe+Zn дає дещо менший результат, що може бути пояснено конкуренцією цих металів в умовах карбонатного хлорозу. Так, маса надземної частини рослин у цьому варіанті перевищувала показник контрольного варіанта на 25,7 % та маса коренів цього варіанта перевищує контрольні показники вже на 28,6 %. Обробка колоїдним розчином Zn призводить до збільшення маси надземної частини на 22,9 % та маси коренів – на 21 %.

1. Зміна маси надземної частини і коренів рослин люпину, вирощених на звичайному ґрунті, через 6 тижнів після обробки

Варіант	Середня маса надземної частини однієї рослини, г	Середня маса коренів однієї рослини, г
---------	--	--

K	4,64±0,16	1,67±0,06
Fe	4,93±0,17 (на 6,3 % більше №1)	2,81± 0,06 (на 68% більше №1)
n	4,97± 0,15 (на 7,1% більше №1)	2,08± 0,05 (на 25 % більше №1)
Fe+Zn	6,12± 0,11 (на 32 % більше №1)	2,67± 0,08 (на 60% більше №1)

2. Середня маса надземної частини і коренів рослин люпину, вирощених на карбонатному ґрунті, через 6 тижнів після обробки

Варіант	Середня маса надземної частини однієї рослини, г	Середня маса коренів однієї рослини, г
K	3,5±0,15	1,4±0,04
Fe	4,6±0,16 (на 31% більше №2)	2,1±0,05 (на 50 % більше №2)
Zn	4,3±0,15 (на 22,9% більше №2)	1,7±0,06 (на 21% більше №2)
Fe+Zn	4,4±0,16 (на 25,7% більше №2)	1,8±0,06 (на 28,6% більше №2)

Висновки

Отже, ураження рослин карбонатним хлорозом викликає порушення у роботі їх фотосинтетичного апарату, про що свідчить збільшення рівня фонові і максимальної флуоресценції та зменшення маси надземної частини та коріння. Обробка рослин колоїдними розчинами металів виявляє позитивну дію та збільшує вегетативну масу рослин. Зміни в роботі фотосинтетичного апарату, які зумовлюються колоїдними розчинами металів, вказують на посилення фотосинтетичної функції у рослин вражених карбонатним хлорозом.

Список літератури

1. Байрак Н.В. Применение метода индукции флуоресценции хлорофилла для изучения неоднородности системы фотосинтеза растений / Н.В. Байрак, В.А. Зуза, Я.А. Погромская // Вісник Харків. нац. ун-ту ім. В.Н.Казаріна. Серія: біологія. – 2008 – Вип. 7, №814. – С. 181-186.
2. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д. Ю. Корнеев – К.: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
3. Островская Л.К. Биологически активные комплексоны металлов для борьбы с хлорозом растений / Л.К. Островская // Журнал Всесоюз. химического общества им. Д.И. Менделеева. – 1984. – №3. – С. 321–327.
4. Островская Л.К. Железо в растительном мире и карбонатный хлороз / Л.К. Островская; – К.: Наук. думка, 1993. – 147 с.
5. Рубин А. Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза /А.Б. Рубин, Т.Е. Кренделева // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С. 225–266.
6. Abou-Zamzam A.M. Nitrogen and bicarbonate relationships with iron nutrition in plants // J. Plant Nutr.- 1984.-7, № 1-5. – P. 587-594.
7. Chen Y Iron nutrition of plants in calcareous soils/ Chen Y, Barak P. // Adv. Agron. – 1984. – № 35. – P.217 – 240.
8. Maxwell K. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. / K. Maxwell and G.N. Johnson // J. Experimental Botany, - 2000. - Vol. 51. - №. 345, P. 659-668.
9. Romanov V. Portable Fluorometer for Express-Diagnostics of Photosynthesis / Romanov V., Fedak V., Galelyuka I., Sarakhan Ye., Skrypnik O. // Principles of Operation and Results of Experimental Researches. Proceeding of the 4th IEEE Workshop on "Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications", IDAACS'2007, Dortmund, P. 570–573, September 6–8, 2007.

10. Son'ko R., Express Biosensor control of maize plants under different agrotechnical procedures. / Son'ko R., Marchenko O., Kolomijez' V., Starodubi N. // Proceedings of the 14th International Meeting on Chemical Sensors in Nurnberg/Germany, 20 - 23 May 2012, pp. 180-188. Elsevier

11. Starodub N.F. Complex of optical biosensors for control of total state of vegetables and estimation of their loading by viruses/ Starodub N.F., Sonko R. V., Romanov V. O., Galelyuka I. P. // In book: "The SENSOR+TEST 2011", AMA Service GmbH, Nuremberg, 2011, pp. 133-138.

*Приведены результаты исследования влияния коллоидных растворов Fe и Zn на фотосинтетическую активность растений *Lupinus Luteus* методом оценки интенсивности флуоресценции хлорофилла. Показаны изменения основных параметров флуоресценции у здоровых растений и пораженных карбонатным хлорозом. При поражении растений карбонатным хлорозом происходит уменьшение эффективности работы фотосистемы II. Обработка растений коллоидными растворами металлов железа и цинка способствует улучшению работы их фотосинтетического аппарата.*

Коллоидные растворы, индукция флуоресценции хлорофилла, карбонатный хлороз.

*The results of study about the effect of colloidal solutions of Fe and Zn, on the photosynthetic activity of plants *Lupinus Luteus* by the determination of the chlorophyll fluorescence intensity. It was shown the change in fluorescence of the main parameters in healthy plants and affected by carbonate chlorosis. When impressed carbonate plant chlorosis the efficiency of photosystem II was decreased. Processing plants by the colloidal solutions of metals iron and zinc improved the work of the photosynthetic apparatus.*

Colloidal solution, induction fluorescence, carbonate chlorosis.