



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82714 (13) C2
(51) МПК (2006)
G01N 21/64
A01G 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БАКТЕРІОЗУ РОСЛИН

1

(21) а200603092

(22) 22.03.2006

(24) 12.05.2008

(46) 12.05.2008, Бюл.№ 9, 2008 р.

(72) КИТАЄВ ОЛЕГ ІГОРЕВИЧ, UA, МОВЧАН
ЯРОСЛАВ ІВАНОВИЧ, UA, КОЛЕСНИК ЮРІЙ
СТЕПАНОВИЧ, UA, ФЕДАК ВОЛОДИМИР СЕМЕ-
НОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ КІБЕРНЕТИКИ ІМ. В.М. ГЛУШКОВА
НАН УКРАЇНИ, UA

(56) SU 1254360 A1, 30.08.86 .

SU 1507253 A1, 15.09.89.

RU 2199730 C2, 27.02.03.

(57) Спосіб ідентифікації бактеріозу рослин, який
включає опромінення листка рослини світлом в
діапазоні довжин хвиль 400÷650нм, прийом, виді-

2

лення, вимірювання і реєстрацію сигналів наведе-
ної флуоресценції в діапазоні довжин хвиль
670÷770нм, який **відрізняється** тим, що в ньому
здійснюють термообробку листка при температурі
40÷70°С протягом 3-7хв. після реєстрації сигналів
наведеної флуоресценції, далі опромінюють лис-
ток в діапазоні хвиль 400÷650нм, виділяють, вимі-
рюють і реєструють сигнал наведеної флуоресце-
нції та порівнюють його із значенням сигналу
флуоресценції до термообробки, а рослину вва-
жають ураженою бактеріозом, якщо сигнал флуо-
ресценції з листка без термообробки перевищує
сигнал флуоресценції з листка після термообробки
більше ніж на 25%.

Спосіб належить до області дослідження ма-
теріалів шляхом визначення фізичних властивос-
тей, зокрема флуоресценції хлорофілу. Спосіб
орієнтовано на застосування у сільському госпо-
дарстві, зокрема в рослинництві та селекційній
роботі.

Відомо ["Способ обнаружения вирусных инфе-
кций растений" SU 1507253; A01G67/00,
G01N21/35], який включає вимірювання показників
у дослідних рослин і контрольної рослини та їх
порівняння по результатам якого визначають на-
явність вірусної інфекції у рослин. В якості показ-
ника реєструють інфрачервоне поглинання листка
рослини при опроміненні його у спектральній обла-
сті 850÷1750см⁻¹ та вимірюванні інтенсивності сві-
тла, у тій саме спектральній області, яке пройшло
через листок, при цьому ураженням вірусною інфе-
кцією вважають зразок, який характеризується
перерозподілом інтенсивностей в порівнянні із
здоровою контрольною рослиною. Швидкість ре-
єстрації 160÷400 см⁻¹/хв. Зараженим вважають
зразок, який характеризується максимальною ін-
тенсивністю поглинання в порівнянні із здоровою
рослиною.

Спільними рисами аналогу і запропонованого
способу є опромінення рослини, прийом та вимі-

рювання оптичного сигналу, що взаємодіє з опро-
міненою областю листа.

Причиною, що заважає одержанню очікувано-
го технічного результату є те, що спосіб-аналог не
дозволяє ідентифікувати бактеріоз рослин.

Найближчим по суті до запропонованого спо-
собу є спосіб одержання, вимірювання, реєстрації
та інтерпретації флуоресценції нативного хлоро-
філу представлений у [роботі Корнеев Д.Ю. "Ин-
формационные возможности индукции флуорес-
ценции хлорофилла", Киев, Альтерпрес, 2002г.,
стр. 15-28].

Спосіб-прототип полягає в опроміненні листа
рослини в діапазоні хвиль 400÷650нм, прийому,
виділенні, вимірюванні і реєстрації сигналів флуо-
ресценції в діапазоні хвиль 670÷770нм.

Спільними рисами прототипу та запропонова-
ного способу є опромінення листа рослини в діа-
пазоні хвиль 400÷650нм, прийому, виділенні, вимі-
рюванні і реєстрації сигналів флуоресценції в
діапазоні хвиль 670÷770нм.

Причиною, що заважає одержанню очікувано-
го технічного результату є те, що у способі прото-
типі не визначені показники флуоресценції натив-
ного хлорофілу, які дозволяють ідентифікувати
бактеріоз рослин.

(13) C2

(11) 82714

(19) UA

Задачею винаходу є вибір таких характерних ознак наведеної флуоресценції хлорофілу, способу їх визначення та інтерпретації, які дозволяють ідентифікувати бактеріоз рослин.

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що запропонований спосіб включає опромінення листка рослини в діапазоні хвиль 400÷650нм, прийому, виділенні, вимірюванні і реєстрації сигналів наведеної флуоресценції в діапазоні хвиль 670÷770нм, також здійснюють термообробку листка при температурі 40÷70°C на протязі 3÷7 хв. після реєстрації сигналів наведеної флуоресценції, наступне опромінення листка в діапазоні хвиль 400÷650нм, виділення, вимірювання і реєстрацію сигналу наведеної флуоресценції та порівнюють його із значенням сигналу флуоресценції до термообробки, а рослину вважають ураженою бактеріозом, якщо сигнал флуоресценції з листка без термообробки перевищує сигнал флуоресценції з листка після термообробки більше ніж на 25%.

Відмінними ознаками запропонованого способу є те, що в ньому здійснюють термообробку листка при температурі 40÷70°C на протязі 3÷7хв. після реєстрації сигналів наведеної флуоресценції, наступне опромінення листка в діапазоні хвиль 400÷650нм, виділення, вимірювання і реєстрацію сигналу наведеної флуоресценції та порівнюють його із значенням сигналу флуоресценції до термообробки, а рослину вважають ураженою бактеріозом, якщо сигнал флуоресценції з листка без термообробки перевищує сигнал флуоресценції з листка після термообробки більше ніж на 25%.

Введення у відомий спосіб операцій термообробки, повторного вимірювання флуоресценції та порівняння її із значенням флуоресценції з того ж листка без термообробки дозволить ідентифікувати бактеріоз рослин по зменшенню сигналу флуоресценції з листка після термообробки.

Відомо, що ураженню бактеріозом схильні до 180 видів рослин, у тому числі сільськогосподарські та садові культури. Інфікованими є в основному коренева і стовбурна частина, а в листя мігрують продукти метаболізму бактерій, які є токсинами, що згубно впливає на хлорофіл. Сприятливі зовнішні умови (висока температура і вологість) сприяють інтенсивному розмноженню бактерій, наприклад (*Ervinia amilovora*), а інтоксикація продуктами, їх метаболізму викликає пригнічення функцій хлорофілу. При цьому листя рослин темніє і осипається, що зовні має вигляд опіку. На ранніх стадіях ураження відбувається міграція токсинів в листя, особливо в черешки і на периферію листків. Відомі способи тестування не дозволяють виявити наявності токсинів в листях, тобто ідентифікувати ураження рослини бактеріозом.

Відомо, що стан рослини визначається станом її фотосинтетичного апарата, тобто концентрацією і станом хлорофілу. Одним з індикаторів стану хлорофілу є наведена флуоресценція хлорофілу. Поява чи відсутність флуоресценції під впливом чинника в порівнянні з контролем може слугувати індикаторною ознакою дії чинника.

В нашому випадку діючим чинником є наявність токсинів в листях рослини. Для виявлення наявності цих токсинів здійснюють термообробку

листка при температурі 40÷70°C на протязі 3÷7 хвилин. Це інтенсифікує вплив токсинів і гасить флуоресценцію ураженого хлорофілу в порівнянні з неуразеним хлорофілом в межах листка. Запропонований спосіб реалізується наступним чином: листок рослини розміщують під світлозахисним кожухом на предметному столику і опромінюють його перпендикулярно до площини листка. Довжину хвилі опромінення вибирають у діапазоні 400÷650нм, який охоплює головні, $\lambda=450\div650\text{нм}$ та проміжні $\lambda=500, 550\text{нм}$ максимуми поглинання нативного хлорофілу. Інтенсивність опромінення активним світлом здійснюють у діапазоні 100÷2000мкмоль фотонів $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, яка підтримує фотосинтез. Вже при інтенсивностях опромінення більших від 450мкмоль фотонів $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ відбувається надійне збудження флуоресценції хлорофілу. Флуоресцентний сигнал приймають у напрямку протилежному до опромінення, з допомогою світлофільтра відділяють сигнал флуоресценції від відбитого сигналу опромінення. Сигнал флуоресценції вимірюють в діапазоні хвиль 670÷770нм, який охоплює обидва максимуми флуоресценції хлорофілу на $\lambda=680, 735\text{нм}$. Після реєстрації сигналу флуоресценції здійснюють термообробку листка при температурі 40÷70°C на протязі 3÷7хв., повторно опромінюють листок в діапазоні хвиль 400÷650нм і відділяють, вимірюють, та реєструють флуоресценцію в діапазоні хвиль 670÷770нм. Термообробка листка при температурі менше 40°C тільки частково гасить флуоресценцію ураженого хлорофілу листка, а термообробка при температурах вище 70°C частково гасить флуоресценцію неуразеного хлорофіла. Термообробка на протязі менше 3хв. гасить флуоресценцію тільки частини ураженого хлорофіла, а термообробка на протязі більше 7хв. гасить флуоресценцію неуразеного хлорофілу. Значення сигналів флуоресценції до термообробки і після термообробки порівнюють. Якщо сигнал флуоресценції з листка після термообробки зменшився більше ніж на 25% в порівнянні з сигналом флуоресценції з того ж листка без термообробки, то рослину вважають ураженою бактеріозом.

Запропонований спосіб ідентифікації ураження рослини бактеріозом, як видно з його опису, може бути реалізований у виробничих умовах, так як для його реалізації використовують елементи загального призначення. Пристрій для реалізації запропонованого способу схематично зображено на кресленні, де 1 - світлозахисний кожух, 2 - листок рослини, 3 - джерело опромінення, 4 - об'єктив, 5 - світлофільтр, 6 - фотоприймач, 7 - цифровий вольтметр. Пристрій працює наступним чином: листок рослини 2 розміщують під світлозахисним кожухом 1 і опромінюють світлодіодами 3 перпендикулярно до площини листка 2. Флуоресцентний сигнал з листка 2 відділяють з допомогою Світлофільтра 5, приймають через об'єктив 4, подають на фотоприймач 6, який перетворює його в електричний сигнал і підсилює. Електричний сигнал з фотоприймача вимірюють і реєструють у цифровій формі з допомогою цифрового вольтметра 7. Далі здійснюють термообробку листка при температурі 60°C на протязі 5 хв. і повторюють операції опро-

мінення листка, виділення, вимірювання і реєстрацію сигналу флуоресценції. Значення сигналу флуоресценції хлорофілу без термообробки порівнюють із значенням сигналу флуоресценції хлорофілу листка після термообробки і у випадку коли флуоресценція після термообробки листка зменшилась більше ніж на 25% в порівнянні з флуоресценцією листка без термообробки - рослину вважають ураженою бактеріозом. При реалізації запропонованого способу для опромінення листка були застосовані суперяскраві сині світлодіоди NSPB500S (Nichia) з довжиною хвилі випромінювання $460\text{nm} \pm 10\text{nm}$. Опромінення листка можна здійснити також з допомогою ртутної лампи або лампи розжарення та спектрального прилада (монохроматора, або світлофільтра) які забезпечать спектральний діапазон $400 \div 650\text{nm}$. Для виділення сигналу флуоресценції застосовано червоний світлофільтр з майларової плівки, який надійно відсікає випромінювання світлодіодів і пропускає сигнал флуоресценції. Виділити сигнал флуоресценції в діапазоні хвиль $670 \div 770$ можна з допомогою інтерференційних світлофільтрів або інших спектральних приладів. Основною вимогою до технічних засобів збудження і виділення флуоресценції є надійне

рознесення їх спектральних показників тобто довжин хвиль. У якості фотоприймача використано фотодіод монолітний з підсилювачем OPT301M (Burr-Brown), у якого максимум чутливості в діапазоні хвиль $680 \div 800\text{nm}$, але фотоприймачем може слугувати фотоелектронний перемножувач з відповідною спектральною характеристикою. Для вимірювання електричного сигналу з підсилювача використано цифровий вольтметр. Термообробку проводили у водяному термостаті, але можна застосувати і сухоповітряний термостат. Як варіант реалізації способу у якості фотоприймача використано цифрову фотокамеру. Це дозволяє з допомогою персонального комп'ютера визначити площу темних плям (уражені зони) в межах листка після термообробки і співставити цю площу із загальною флуоресцентною площею листка. Співвідношення неураженої і ураженої площі слугує показником ступеня і стадії ураження рослини. В експерименті тестувалось ураження яблуні *Malus domestica* сорту "Джонатан" бактеріозом, викликаним бактеріями *Erwinia amylovora*.

Запропонований спосіб дозволяє ідентифікувати бактеріоз рослин на ранніх стадіях ураження.

