



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82894 (13) C2
(51) МПК (2006)
G01N 21/64
A01G 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ КАРБОНАТНОГО ХЛОРОЗУ РОСЛИН

1

(21) а200603396

(22) 28.03.2006

(24) 26.05.2008

(46) 26.05.2008, Бюл.№ 10, 2008 р.

(72) ВОЙТОВИЧ ІГОР ДАНИЛОВИЧ, UA, КИТАЄВ ОЛЕГ ІГОРЕВИЧ, UA, КОНДРАТЕНКО ПЕТРО ВАСИЛЬОВИЧ, UA, КЛОЧАН ПЕТРО СТЕПАНОВИЧ, UA, РОМАНОВ ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA, ФЕДАК ВОЛОДИМИР СЕМЕНОВИЧ, UA, КОЗАК НАТАЛЛЯ ІВАНІВНА, UA

(73) ІНСТИТУТ КІБЕРНЕТИКИ ІМ. В.М. ГЛУШКОВА НАН УКРАЇНИ, UA, ІНСТИТУТ САДІВНИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA

(56) SU 1507253 A1, 15.09.1989.

DD 300049 A7, 21.05.1992.

Чернюк С.О. Екологія вірусів рослин заповідника "Асканія-Нова". Автореф... канд.біол.н. 03.00.16 - екологія. Київ - 2002.

2

(57) Спосіб ідентифікації карбонатного хлорозу рослин, який ґрунтується на опроміненні листка рослини після темної фази світлом з довжиною хвилі в діапазоні 400-650нм, прийомі, вимірюванні і реєстрації сигналів флуоресценції в діапазоні довжин хвиль 670-770нм, із значень яких будують криву індукції флуоресценції з виділенням початкового F_0 і максимального F_m значень флуоресценції, який **відрізняється** тим, що в ньому визначають ширину кривої індукції флуоресценції на рівні $0,75 (F_m - F_0)$ для дослідної τ_d і контрольної τ_k рослин, а одержані значення порівнюють і при значенні $\tau_d \geq 2 \tau_k$ дослідну рослину вважають ураженою карбонатним хлорозом.

Спосіб належить до області дослідження матеріалів шляхом визначення фізичних властивостей, (зокрема визначення ураженості рослин карбонатним хлорозом) шляхом запису і аналізу кривої індукції флуоресценції нативного хлорофілу рослинних об'єктів. Спосіб орієнтовано на застосування у сільському господарстві, зокрема рослинництві, селекційній роботі та моніторингу стану ґрунтового середовища, бо карбонатний хлороз є індикатором цинкового та залізного голодування рослин і підвищеного РН ґрунту.

Зовнішні ознаки ураженості листя хлорозом, зокрема карбонатним, хлоротичною плямистістю, вірусною строкатістю, тощо, схожі і розрізнити їх складно, навіть при явних ознаках, а окомірні визначення суб'єктивні.

Відомо [«Способ обнаружения вирусных инфекций растений» SU 1507253; A01G67/00, G01N21/35], який полягає у реєстрації інфрачервоного поглинання листя рослини у спектральній області 850÷1750см у мінус першому ступені із швидкістю 160÷400см у мінус першому ступені /хв. Ураженням вважають зразок з максимальною інтенсивністю інфрачервоного поглинання в порівнянні із здоровою рослиною.

Спільними рисами аналогу і запропонованого способу є опромінення рослини, прийом та вимірювання оптичного сигналу, що взаємодіє з опроміненою областю листа. Причиною, що заважає одержанню очікуваного технічного результату є те, що спосіб-аналог не дозволяє ідентифікувати карбонатний хлороз рослин.

Відомо спосіб запису, інтерпретації та використання індукції флуоресценції нативного хлорофілу представлений у [роботі Корнєєв Д.Ю. «Информационные возможности индукции флуоресценции хлорофилла», Киев, Альтерпрес, 2002г., ст.15-28].

Спосіб-аналог запису кривої індукції флуоресценції хлорофілу полягає в освітленні листя рослини в діапазоні хвиль 400-650нм після його темної адаптації, прийому та вимірюванні сигналів флуоресценції в діапазоні хвиль 670÷770нм та побудові кривої індукції флуоресценції хлорофілу з поточних значень флуоресценції.

Спільними рисами аналогу та запропонованого способу є вимірювання і реєстрація поточних значень флуоресценції з яких будують криву індукції флуоресценції нативного хлорофілу.

Причиною, що заважає одержанню очікуваного технічного результату є те, що у способі аналогу

(13) C2

(11) 82894

(19) UA

не визначені показники, які дозволяють ідентифікувати карбонатний хлороз.

Найближчим по суті до запропонованого способу є [«Спосіб реєстрації та використання світло індукованих вимірювань флуоресценції хлорофілу», патент DD 300049, A7, G01N21/64].

Спосіб прототип полягає в одержанні електронної реєстрації індукційної кривої індукції флуоресценції хлорофілу, визначенні двох показників кривої, зокрема початкової F_0 і максимальної F_m флуоресценції, та їх співвідношення, по якому і визначають стан рослини. Криву індукції флуоресценції хлорофілу будують із поточних значень флуоресценції, одержаних при опроміненні листка рослини світлом у діапазоні хвиль 400÷650нм, збуджуючим флуоресценцію хлорофілу, після попереднього опромінення коротким насичуючим спалахом, темноті фазі, наступного прийому, виділення і вимірювання сигналів флуоресценції у діапазоні хвиль 670÷770нм.

Спільними рисами прототипу і запропонованого способу є опромінення листка рослини після темноті фазі світлом з довжиною хвилі 400÷650нм, прийому, вимірюванні і реєстрації сигналів флуоресценції з довжиною хвилі 670÷770нм, із значень яких будують криву індукції флуоресценції з виділенням початкового F_0 і максимального F_m значень флуоресценції.

Причиною, що заважає одержанню очікуваного технічного результату є те, що у способі прототипу не визначені показники кривої індукції флуоресценції хлорофілу, які дозволяють ідентифікувати карбонатний хлороз рослин.

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

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що запропонований спосіб включає опромінення листка рослини після темноті фазі світлом з довжиною хвилі 400÷650нм, прийому, вимірюванні і реєстрації сигналів флуоресценції з довжиною хвилі 670÷770нм, із значень яких будують криву індукції флуоресценції з виділенням початкового F_0 і максимальної F_m значень флуоресценції, а також визначають ширину кривої індукції флуоресценції на рівні 0,75 ($F_m - F_0$) для дослідної τ_d і контрольної τ_k рослин, а одержані значення порівнюють і при значенні $\tau_d \geq 2\tau_k$ дослідну рослину вважають ураженою карбонатним хлорозом.

Відмінними ознаками запропонованого способу є те, що в ньому визначають ширину кривої індукції флуоресценції на рівні 0,75 ($F_m - F_0$) для дослідної τ_d і контрольної τ_k рослин, а одержані значення порівнюють, і призначені $\tau_d \geq 2\tau_k$ дослідну рослину вважають ураженою карбонатним хлорозом.

Введення у відомий спосіб операцій визначення ширини кривої індукції флуоресценції хлорофілу на рівні 0,75 варіабельної флуоресценції дослідної і контрольної рослин дозволить ідентифікувати ураженість рослин карбонатним хлорозом по збільшенню ширини кривої індукції флуоресценції хлорофілу дослідної рослини в по-

рівнянні з шириною кривої індукції флуоресценції хлорофілу контрольної рослини більш ніж вдвічі.

На Фіг. зображено загальний вигляд кривої індукції флуоресценції хлорофілу (індукційна крива, крива Каутського) де значення флуоресценції представлені у відносних одиницях:

F_0 - початкове значення флуоресценції після початку опромінення;

F_m - максимальне значення флуоресценції;

$F_m - F_0$ - варіабельна флуоресценція.

t_1 - час досягнення 0,75 варіабельної флуоресценції з боку наростання кривої індукції флуоресценції хлорофілу;

t_2 - час досягнення 0,75 варіабельної флуоресценції з боку падіння кривої індукції флуоресценції хлорофілу для контрольної рослини.

t_3 - час досягнення 0,75 варіабельної флуоресценції з боку падіння кривої індукції флуоресценції хлорофілу для дослідної рослини.

τ_k , τ_d - ширина кривої індукції флуоресценції хлорофілу відповідно контрольної і дослідної рослини.

Проміжок часу між точками t_1 і t_2 приймають за ширину кривої індукції флуоресценції хлорофілу на рівні 0,75 варіабельної флуоресценції для контрольної рослини τ_k , а проміжок часу між точками t_1 і t_2 приймають за ширину кривої індукції флуоресценції хлорофілу для дослідної рослини τ_d . При ураженості рослини карбонатним хлорозом, саме цей проміжок збільшується в порівнянні дослідної і контрольної рослин.

Відомо, що певні ділянки кривої індукції флуоресценції хлорофілу є індикаторами відповідних фізіологічних процесів у ланцюгу фотосинтезу, Тому порушення окремих ланок фотосинтезу, викликані екзо- та ендогенними чинниками проявляються у характерних змінах відповідних ділянок кривої індукції флуоресценції хлорофілу. Такі зміни кривої індукції флуоресценції хлорофілу дослідної рослини, на яку діє збуджуючий чинник у порівнянні з індукцією флуоресценції хлорофілу контрольної рослини на яку чинник не діє, свідчать про вплив чинника. Ідентифікація дії чинника потребує вибору специфічного показника кривої індукції флуоресценції хлорофілу якому відповідає дія саме цього чинника. Таким показником на основі експериментальних досліджень вибрано ширину кривої індукції флуоресценції хлорофілу на рівні 0,75 різниці максимального і початкове значення флуоресценції; тобто на рівні 0,75 варіабельної флуоресценції. Саме цей показник вибрано ідентифікаційною ознакою ураженості карбонатним хлорозом.

Запропонований спосіб реалізує наступний порядок визначень: з допомогою хронофлуориметра записують криву індукції флуоресценції хлорофілу контрольної рослини шляхом освітлення листа рослини після темноті фазі, прийому, вимірювання та реєстрації сигналів флуоресценції. Листок рослини витримують без доступу світла від 2 до 15хв у конверті з темного паперу, або з допомогою виносного оптоелектронного сенсора, який має зажим із двома пластинами, між якими розміщують листок. Далі листок, чи його фрагмент, опромінюють світлом, яке збуджує флуоресценцію

хлорофілу. Частіше довжину хвилі опромінення вибирають у діапазоні поглинання хлорофілу 400-650нм, який охоплює головні $\lambda=450\text{нм}$, $\lambda=650\text{нм}$ та проміжні $\lambda=500\text{нм}$, $\lambda=550\text{нм}$ максимуми поглинання нативного хлорофілу. Інтенсивність опромінення актинічним світлом здійснюють у діапазоні 100-2000 мкмоль фотонів $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, яка підтримує фотосинтез. Одночасно з освітленням здійснюють прийом, виділення, вимірювання і реєстрацію сигналів флуоресценції з освітленої плями листка в діапазоні довжин хвиль 670÷770нм. Цей діапазон охоплює обидва максимуми флуоресценції нативного хлорофілу на $\lambda=680\text{нм}$ та $\lambda=735\text{нм}$. Із поточних значень флуоресценції будують криву індукції флуоресценції, виділяють початкове F_0 та максимальне F_m значення флуоресценції і розраховують 0,75 варіабельної флуоресценції $0,75(F_m - F_0)$ (див. Фіг.).

З кривої індукції флуоресценції з боку наростання на рівні 0,75 варіабельної флуоресценції визначають t_1 , з боку спаду кривої визначають t_2 . Ширину кривої індукції флуоресценції для контрольної рослини τ визначають як $\tau_K = t_2 - t_1$. Аналогічно будують криву індукції флуоресценції хлорофілу з поточних значень флуоресценції дослідної рослини з підозрою на ураження хлорозом, і теж визначають ширину кривої індукції флуоресценції хлорофілу на рівні 0,75 варіабельної флуоресценції. Якщо ширина кривої індукції флуоресценції хлорофілу дослідної рослини більша за ширину кривої індукції флуоресценції хлорофілу контрольної рослини більше ніж вдвічі ($\tau_d \geq 2\tau_K$), то дослідну рослину вважають ураженою саме карбонатним хлорозом.

Запропонований спосіб ідентифікації ураженості рослини карбонатним хлорозом, як видно з його опису, може бути реалізований у виробних умовах, так як для його реалізації використовують серійні хронофлуорометри, які дозволяють записувати криву індукції флуоресценції хлорофілу. При реалізації способу був застосований переносний флуорометр «Флоратест» виробництва державного Науково-інженерного центру мікроелектроніки Інституту кібернетики НАН України, але

можна використати інші прилади, наприклад, портативний хлорофіл-флуорометр PAM-2100 німецької фірми Heinz Walz GmbH, або хлорофіл-флуорометр OS-30p фірми OPTI-Sciences, USA. Спосіб реалізовано при тестуванні карбонатного хлорозу саджанців яблуні (*Malus domestica*) сорту «слава переможця». Листок неуразеної (контрольної) яблуні розміщували між пластинами сенсора і витримували без світла 10хв. Для опромінення листка рослини було використано 4 синіх світлодіоди NSPB500S (Nisbia) з довжиною хвилі випромінювання $460\text{нм} \pm 10\text{нм}$. Діоди розміщені попарно на протилежних сторонах каркаса, симетрично відносно фотоприймача і в межах плями освітлення діаметром 7мм створюють рівномірне освітлення. При інтенсивності освітлення $450\text{мкмоль} \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ і більше сигнал індукованої флуоресценції надійно фіксується. Для виділення сигналу флуоресценції нами був застосований широкополосний червоний світлофільтр з майларової плівки, який забезпечує надійне відсікання випромінювання світлодіодів і пропускання сигналів флуоресценції в діапазоні 670÷770нм. У якості фотоприймача використано монолітний з підсилювачем світлодіод OPT301M (Burr-Brown), у якого максимум чутливості в діапазоні хвиль 650÷800нм. Для вимірювання і реєстрації сигналів використано мікроконтролер ADuC 842 (Analog Devices). Спеціалізовані програми роботи контролера дозволяють визначити F_0 , F_m , $0,75(F_m - F_0)$, t_1 , t_2 , t_3 , τ_K , τ_d , та $\tau_d:\tau_K$. Визначена ширина індукційної кривої контрольної яблуні становила $\tau_K = 320\text{мсек}$. Аналогічно здійснювалось визначення ширини індукційної кривої з листка яблуні ураженої карбонатним хлорозом. При цьому ширина індукційної кривої була рівною 740мсек. Відношення $\tau_d:\tau_K = 2.3$ засвідчує ураженість карбонатним хлорозом. Неуразені саджанці вибирались з сортопитомника, а уражені вибирались на основі окопних визначень ураження та контролю підвищеного РН ґрунту. Запропонований спосіб дозволяє ідентифікувати карбонатний хлороз на ранніх стадіях ураження при масових експресних визначеннях.

