



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83679 (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 ВІРУСНОЇ СТРОКАТОСТІ РОСЛИН

1

(21) а200603472
(22) 30.03.2006
(24) 11.08.2008
(46) 11.08.2008, Бюл.№ 15, 2008 р.
(72) ВОЙТОВИЧ ІГОР ДАНИЛОВИЧ, UA, КИТАЄВ
ОЛЕГ ІГОРЕВИЧ, UA, МІЩЕНКО ЛІДІЯ ТРОХИМ-
ВНА, UA, БУБЛИК МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
UA, КЛОЧАН ПЕТРО СТЕПАНОВИЧ, UA, РОМА-
НОВ ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA, ФЕ-
ДАК ВОЛОДИМИР СЕМЕНОВИЧ, UA
(73) ІНСТИТУТ КІБЕРНЕТИКИ ІМ. В.М. ГЛУШКОВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, UA,
ІНСТИТУТ САДІВНИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕ-
МІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA
(56) SU 1768071 A1, 15.10.1992
UA 35033 A, 15.03.2001
FR 2837574, 26.09.2003

2

DE 10002880, 13.06.2001
JP 2001264254, 26.09.2001
DD 300049 A7, 21.05.1992
SU 1507253 A1, 15.09.1989

(57) Спосіб ідентифікації вірусної строкатості рос-
лин, який полягає в опроміненні листка рослини
після темпової фази світлом в діапазоні довжин
хвиль 400÷650 нм, прийомі, вимірюванні і реєстра-
ції сигналів флуоресценції в діапазоні довжин
хвиль 670÷770 нм, із значень яких будують індук-
ційну криву, який **відрізняється** тим, що в ньому
визначають значення стаціонарної флуоресценції
в області листка F_{TC} та між судинами того ж листка
 F_{TM} і порівнюють ці значення, а по величині
 $F_{TC} \geq 1,5 F_{TM}$ рослину вважають ураженою вірусною
строкатістю.

Спосіб належить до області дослідження ма-
теріалів шляхом визначення фізичних властивос-
тей, зокрема визначення ураженості рослин віру-
сною строкатістю, шляхом запису і аналізу кривої
індукції флуоресценції нативного хлорофілу (інду-
кційна крива, крива Каутського) рослинних об'єктів.
Спосіб орієнтовано на застосування у сільському
господарстві, зокрема рослинництві та селекційній
роботі.

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

Відомо «Способ обнаружения вирусных инфе-
кций растений» SU 1507253; A01G 67/00, G01N
21/35, який полягає у реєстрації інфрачервоного
поглинання листя рослини у спектральній області
850-1750 см у мінус першому ступені із швидкістю
160-400 см у мінус першому ступені/хв. Ураженням
вважають зразок з максимальною інтенсивністю
інфрачервоного поглинання в порівнянні із здоро-
вою 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 очікуваного технічного результату є те,
що спосіб-аналог не дозволяє ідентифікувати віру-
сну строкатість рослин.

Відомо спосіб запису, інтерпретації та викори-
стання індукції флуоресценції нативного хлорофі-
лу представлений у роботі Корнев Д.Ю. «Инфор-
мационные возможности индукции
флуоресценции хлорофилла», Киев, Альтерпрес,
2002г.

Спосіб-аналог запису кривої індукції флуорес-
ценції хлорофілу полягає в освітленні листя росли-
ни в діапазоні хвиль 400÷650 нм після його темно-
вої адаптації, прийому та вимірюванні сигналів
флуоресценції в діапазоні хвиль 670÷770 нм та
побудові індукційної кривої з поточних значень
флуоресценції.

Спільними рисами аналогу та запропоновано-
го способу є вимірювання і реєстрація поточних
значень флуоресценції з яких будують індукційну
криву флуоресценції нативного хлорофілу.

Причиною, що заважає одержанню очікувано-
го технічного результату є те, що у способі аналогу
не визначені показники, які дозволяють ідентифі-
кувати вірусну строкатість рослин.

C2
(13)

83679
(11)

UA
(19)

Найближчим по суті до запропонованого способу є «Спосіб реєстрації та використання світло-індукованих вимірювань флуоресценції хлорофілу», патент DD 300049, A7 GO1N 21/64.

Спосіб прототип полягає в одержанні і електро-нній реєстрації індукційної кривої, визначенні двох показників кривої, зокрема початкової F_0 і максимальної F_m флуоресценції, та їх співвідношення, по якому і визначають стан рослини. Індукційну криву 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 фази, наступного прийому, виділення і вимірювання сигналів флуоресценції у діапазоні хвиль 670÷770нм.

Спільними рисами прототипу і запропонованого способу є опроміненні листка рослини після темноті фази світлом з довжиною хвилі 400÷650нм, прийому, вимірюванні і реєстрації сигналів флуоресценції з довжиною хвилі 670÷770нм, із значень яких будують криву індукції флуоресценції хлорофіла.

Причиною, що заважає одержанню очікуваного технічного результату є те, що у способі прототипу не визначені показники індукційної кривої, які дозволяють ідентифікувати вірусну строкатість рослин.

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

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що запропонований спосіб включає опромінення листка рослини після темноті фази світлом в діапазоні довжин хвиль 400÷650нм, прийому, вимірюванні і реєстрації сигналів флуоресценції в діапазоні довжин хвиль 670÷770нм, із значень яких будують криву індукції флуоресценції, а також визначають значення стаціонарної флуоресценції в області судини листка F_{TC} та між судинами тогож листка F_{TM} і порівнюють ці значення, а по величині $F_{TC} > 1,5 F_{TM}$ рослину вважають ураженою вірусною строкатістю.

Відмінними ознаками запропонованого способу є те, що в ньому визначають значення стаціонарної флуоресценції в області судини листка F_{TC} та між судинами токож листка F_{TM} і порівнюють ці значення, а по величині $F_{TC} > 1,5 F_{TM}$ вважають рослину ураженою вірусною строкатістю.

Введення у відомий спосіб операцій виділення значень стаціонарної флуоресценції, визначених в області судини листка та між судинами і їх порівняння дозволить ідентифікувати ураженість рослини вірусною строкатістю по збільшенню величини стаціонарної флуоресценції хлорофілу, визначеної в області судини в порівнянні з величиною стаціонарної флуоресценції, визначеної в міжсудинній області листка.

На Фіг.1 зображено загальний вид індукційної кривої (крива індукції флуоресценції хлорофілу, крива Каутського) де значення флуоресценції представлено у відносних одиницях:

C - хід індукційної кривої для області судини;

M - хід індукційної кривої для міжсудинної області;

F_{TC} - значення усталеної флуоресценції для області судини;

F_{TM} - значення усталеної флуоресценції для міжсудинної області.

На Фіг.2 схематично зображено листок рослини з точками вимірювань наведеної флуоресценції, де точки C і M відповідно області судини і міжсудинними.

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 індукційної кривої. Такі зміни індукційної кривої дослідної рослини, на яку діє збуджуючий чинник у порівнянні з індукційною кривою контрольної рослини на яку чинник не діє, свідчать про вплив чинника. Ідентифікація дії чинника потребує вибору специфічного показника індукційної кривої якому відповідає дія саме цього чинника. Такими показниками в результаті експериментальних досліджень вибрано значення стаціонарної флуоресценції визначені в міжсудинній області листка F_{TM} , як контроль і в області судини F_{TC} , як в зоні ураження. Саме ці показники вибрано ідентифікаційною ознакою ураженості вірусною строкатістю.

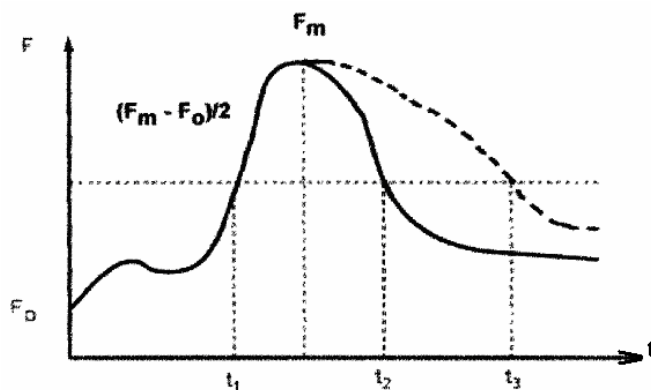
Запропонований спосіб реалізує наступний порядок визначень: з допомогою хроофлуориметра записують індукційну криву M (Фіг.1) для міжсудинної зони M листка (Фіг.2) рослини шляхом опромінення міжсудинної зони листка рослини після темноті фази, прийому, вимірювання та реєстрації сигналів флуоресценції. 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 міжсудинний фрагмент зони листка опромінюють світлом, яке збуджує флуоресценцію хлорофілу. Частіше довжину хвилі опромінення вибирають у діапазоні поглинання хлорофілу 400÷650нм, який охоплює головні $\lambda=450$ нм, $\lambda=650$ нм та проміжні $\lambda=500$ нм, $\lambda=550$ нм максимумами поглинання нативного хлорофілу. Інтенсивність опромінення активним світлом здійснюють у діапазоні $100\div 2000$ мкмоль фотонів $m^{-2} s^{-1}$, 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 максимума флуоресценції нативного хлорофілу на $\lambda=680$ нм та $\lambda=735$ нм. Із поточних значень флуоресценції будують індукційну криву флуоресценції і виділяють значення стаціонарної флуоресценції (F_{TM} , Фіг.1).

Аналогічно будують індукційну криву (C. Фіг.1) флуоресценції хлорофілу з поточних значень флуоресценції для області судини листка (C. Фіг.2) і виділяють значення стаціонарної флуоресценції (F_{TC} , Фіг.1). Виділені значення F_{TC} і F_{TM} порівнюють. Якщо $F_{TC} > 1,5 F_{TM}$, то рослину вважають ураженою вірусною строкатістю.

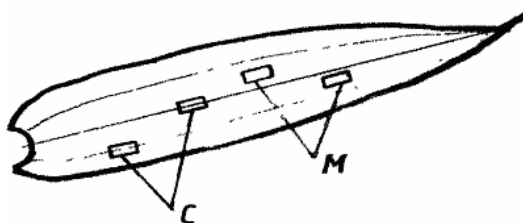
В залежності від конструкції сенсорної частини приладу, яка включає джерело опромінення, світлофільтр та фотоприймач, застосовують послідовне, при одноканальній конструкції сенсора, або паралельне, при двоканальній конструкції сенсора, вимірювання наведеної флуоресценції. При одноканальній конструкції оптичну вісь сенсора спочатку орієнтують на міжсудинну область листка і записують індукційну криву, а потім переміщують сенсор, орієнтуючи його оптичну вісь на область судин і знову записують індукційну криву. При застосуванні двоканального сенсора оптичні вісі каналів орієнтовані паралельно відповідно на області судин і між судинами. Перевагами паралельного вимірювання флуоресценції при двоканальній конструкції сенсора є однакові темнові фази та умови вимірювань.

Запропонований спосіб ідентифікації ураженої рослини вірусною строкатістю, як видно з його опису, може бути реалізований у виробних умовах, так як для його реалізації використовують серійні хронофлуорометри, які дозволяють записувати індукційну криву. При реалізації способу був застосований одноканальний 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 вірусної строкатості злаків, зокрема ячменю (*Hordeum vulgare*). Листок неуразеної (контрольної) яблуні розміщували між пластинами сенсора і витримували без світла 10хв. Для опромінення листка рослини було використано 2 синіх світлодіодів NSPB500S (Nisbia) з довжиною хвилі випромінювання $460\text{nm} \pm 10\text{nm}$. Діоди розміщені попарно на протилежних сторонах каркаса, симетрично відносно фотоприймача і в межах полоски освітлення розміром $1,5 \times 3\text{mm}$ створюють рівномірне освітлення. При інтенсивності освітлення $450\text{мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ і більше сигнал індукованої флуоресценції надійно фіксується. Для виділення сигналу флуоресценції нами застосовано червоний світлофільтр з майларової плівки, який забезпечує надійне відсікання випромінювання емітторів і пропускання сигналів флуоресценції в. У якості фотоприймача використано монолітний з підсилювачем світлодіод OPT301M (Burr-Brown), у якого максимум чутливості в діапазоні хвиль $650 \div 800\text{nm}$. Для вимірювання і реєстрації сигналів використано мікро контролер ADuC 842 (Analog Devices). Спеціалізовані програми роботи контролера дозволяють визначити F_{TC} та F_{TM} . При $F_{TC} \geq 1,5F_{TM}$ дослідну рослину вважають ураженою вірусною строкатістю. Запропонований спосіб дозволяє ідентифікувати вірусну строкатість на ранніх стадіях ураження при масових експресних визначеннях.



Фіг. 1



Фіг. 2