УДК 581.132, 53.082.5

М.Г. ТАРНОВСЬКИЙ, Я.Ю. ЯНКОВСЬКИЙ

ОПТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ РОСЛИН ДЛЯ ЗАДАЧ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ТА ЕКОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ

Вінницький національний технічний університет
95, Хмельницьке шосе, м. Вінниця, 21021, Україна

Анотація. Розглянуті основні оптичні методи, що можуть бути використані для аналізу функціонального стану рослин, проаналізовані особливості їх застосування при експрес-діагностиці.

Аннотация. Рассмотрены основные оптические методы, которые могут быть использованы для анализа функционального состояния растений, проанализированы особенности их применения при экспресс-диагностики.

Abstract. The main optical methods that can be used to analyze the functional state of the plants, analyzed the features of their use in rapid diagnosis.

Ключові слова: фотосинтез, хлорофіл, спектр поглинання, флуоресценція, реакційні центри фотосистеми.

ВСТУП

Підвищення якості та ефективності вирощування рослинної сільськогосподарської продукції при оптимальному використанні господарських та природних ресурсів вимагає постійного аналізу фізіологічного стану посівів сільськогосподарських культур. Достовірність та ефективність методів такого аналізу впливає на відповідність та оперативність проведення різноманітних заходів, спрямованих на збагачення поживними речовинами ґрунтів, боротьбу з хворобами, усунення негативних наслідків природних факторів та погодних умов. Поряд із цим, за фізіологічним станом рослинних організмів наземних та водних екосистем можна виявляти зміни у навколишньому середовищі, викликані антропогенним впливом господарської діяльності людини. У всіх цих випадках принципово важливо отримувати інформацію про порушення фізіологічного стану рослин задовго до того, як ці порушення набудуть зовнішніх ознак. Цим вимогам відповідають сучасні біофізичні методи діагностики стану клітин, які основані на реєстрації початкових порушень клітинного метаболізму [1]. Серед них найбільше поширення останнім часом отримали оптичні методи, які дозволяють ефективно проводити ранню експрес-діагностику фізіологічного стану рослини у природних умовах.

Життєдіяльність вищих рослинних організмів пов'язана з процесом фотосинтезу, який є головним поставщиком енергії у них. Фотосинтез є ключовою ланкою складної системи метаболізму, що забезпечує в підсумку ріст і розвиток вищих рослинних організмів. У фотосинтезі відбувається перетворення енергії світла в енергію хімічних зв'язків продуктів фотосинтезу.

Результати біофізичних досліджень фотосинтезу [2] створюють наукову основу методів автоматичного керування ростом фотосинтезуючих організмів у фотобіотехнології і методів експрес-діагностики стану рослинних організмів у сільському господарстві та екологічному моніторингу. Різні природні умови та зовнішні фактори, у тому числі стресового характеру, впливають на продуктивність фотосинтезу. Джерелом необхідної інформації про подібні зміни може служити хлорофіл, при участі якого і відбувається фотосинтез. Порушення фізіологічного стану вищих рослинних організмів вже на початковому етапі викликає зміни у первинних стадіях фотосинтезу, що супроводжується певними змінами кількісної складової хлорофілу та його оптичних властивостей. Тому хлорофіл можна розглядати як свого роду природний датчик стану клітин вищих рослинних організмів. Саме оптичні властивості хлорофілу, які можна досліджувати у режимі реального часу, служать джерелом інформації при діагностуванні фізіологічного стану рослин [2-4].

© М.Г. ТАРНОВСЬКИЙ, Я.Ю. ЯНКОВСЬКИЙ, 2012

ОПТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ХЛОРОФІЛУ ЯК ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРИ АНАЛІЗІ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ РОСЛИН

Основними оптичними методами для дослідження стану клітин рослинних організмів є спектральні (фотометричні) та люмінесцентні (флюорометричні) методи. У фотометричних методах використовується вибіркове поглинання світла хлорофілом, за яким визначається середня кількість хлорофілу, що приходиться на одиницю площі зеленого листа. У теперішній час відомо біля 10 форм хлорофілів. Вони відрізняються за хімічним складом, забарвленню, розповсюдженості серед живих організмів [5]. У всіх вищих рослин містяться хлорофіли a та b, спектральні криві поглинання для яких наведені на рис. 1 [6].

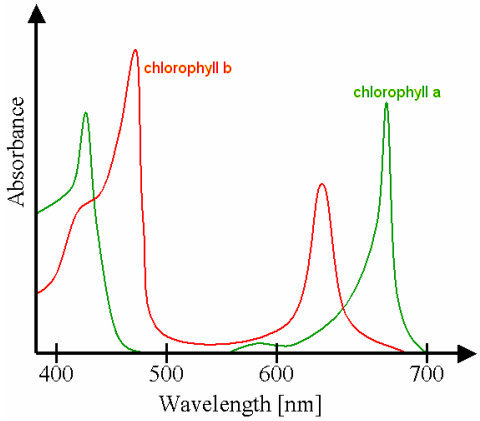

Рис. 1. Спектри поглинання двох основних форм хлорофілу a та b

У дослідженнях за фотометричними методами використовують як монохроматичне світло, так і поліхроматичне. Інформаційним вимірювальним параметром є інтенсивність випромінювання тих довжин хвиль, що відповідають спектральним максимумам поглинання хлорофілу. При використанні монохроматичного світла довжину хвилі вибирають такою, для якої обидві форми хлорофілу поглинають світло однаково. Як видно з рис. 1 такими довжинами хвиль є довжини біля 450 нм та 650 нм.

Класичний метод визначення концентрації хлорофілу полягає в тому, що з листів рослини пустотілою трубочкою стандартного діаметра роблять "висічки" фіксованої площі. З отриманого препарату після його розтирання готують спиртову витяжку хлорофілу, яку заливають у кювети. Далі спектрофотометричним методом визначається концентрація хлорофілу в розчині. Отримане значення перераховують у поверхневу щільність з урахуванням відомої площі висічки [6]. Така методика є достатньо трудомісткою і вимагає значних витрат часу для оцінювання стану рослин на великій площі.

Іншим підходом є спосіб, при якому щільність хлорофілу у листах рослини вимірюється за поглинанням світлового потоку у них. Він знаходить застосування у портативних пристроях, призначених для проведення досліджень у польових умовах. Вимірювання можуть проводитися як у світлі, що відбивається від листів рослини [7], так і у світлі, що проходить крізь них [8]. Для досягнення високої точності та достовірності вимірювання проводяться на двох довжинах хвиль [7, 8]. Одна довжина хвилі зазвичай вибирається в червоній області спектру біля 650 нм, інша – в ближній інфрачервоній області (наприклад, 910 нм), де поглинання хлорофілу є слабим. При цьому застосовується імпульсний режим формування світлових сигналів. Можливий варіант, при якому вміст хлорофілу оцінюється за поглинанням сонячного світла. У цьому випадку інформативним параметром є сонячне випромінювання відбите від зеленої маси. Проте такий спосіб навряд чи може конкурувати з попередніми через свою чутливість до багатьох факторів.

Методи флюорометричного аналізу засновані на вимірюванні випромінювання, що виникає у результаті виділення енергії збудженими молекулами аналізованої речовини. Можливість їх застосування для оцінювання стану рослини обумовлена тим [2, 9], що не використана у фотосинтезі енергія поглинених квантів світла переходить або в тепло, або у флуоресценцію хлорофілу. Параметри флуоресценції є показником стану та ефективності протікання процесів фотосинтезу, оскільки зменшення ефективності використання світлової енергії у фотосинтезі веде до збільшення інтенсивності флуоресценції.

Під час флуоресценції, зазвичай завжди, спостерігається Стоксов зсув випромінювання люмінесценції відносно поглинання у бік більших довжин хвиль [9]. У відповідності до цього, для збудження флуоресценції хлорофілу, спектр якої лежить в області [4] 660-800 нм, використовують

випромінювання з довжиною хвилі 480 нм [10] або 532 нм [11-13].

В нормальних умовах не більше 3% енергії електронного збудження хлорофілу переходить в енергію світла флуоресценції у вигляді так званої фонової флуоресценції F0 [2, 4]. Мале значення фонової флуоресценції F0 говорить про активне використання клітинами енергії поглиненого світла. Цей рівень флуоресценції відповідає умовам, коли усі реакційні центри фотосистеми перебувають у так званому "відкритому" робочому стані, при якому вони ненасичені. При насиченні реакційних центрів фотосистеми поглинена світлова енергія вже не використовується на фотосинтез і флуоресценція хлорофілу зростає, досягаючи максимального значення Fm. Насичення реакційних центрів може відбуватися при збільшенні інтенсивності світлового потоку. Тому на інтенсивність спектральних ліній флуоресценції хлорофілу впливають не лише умови в яких перебуває рослина, а й інтенсивність та тривалість світлового потоку збудження. У зв'язку з цим для оцінювання фізіологічного стану рослини краще використовувати такий параметр, як відносний вихід змінної флуоресценції [14], що визначається відношенням (Fm - F0)/Fm. Різниця енергій флуоресценції хлорофілу Fv = Fm - F0 називається змінною флуоресценцією. Вона відповідає тій частині енергії світла, що використовується у фотосинтезі, тобто характеризує активність початкових стадій фотосинтезу. У відповідності до цього відносний вихід змінної флуоресценції найбільш точно характеризує ефективність первинних процесів фотосинтезу. Для спостереження фонової флуоресценції F0 використовується світловий потік збудження малої інтенсивності, який спрямовують на рослину, адаптовану до темряви [2, 14, 15]. Насичення реакційних центрів фотосистеми досягають освітленням спалахом інтенсивного світла.

Іншим джерелом інформації про характер функціонування апарату фотосинтезу є процес уповільненої флуоресценції [2, 16]. Це явище полягає у тому, що після світлового збудження у клітинах, в яких відбувається фотосинтез, спостерігається слабе, довго згасаюче світіння, що випромінюється хлорофілом. Це світіння виникає вже після припинення флуоресценції F0 за рахунок енергії, що виділяється в ході темрявих реакцій первинних продуктів фотосинтезу. Спектральний склад уповільненої флуоресценції є таким самим, тому виділити її можна тільки за часом. Уповільнена флуоресценція може спостерігатися протягом кількох секунд і навіть десятків секунд. Для її спостереження використовується імпульсний сигнал збудження, а реєстрація флуоресценції здійснюється з деякою часовою затримкою після його завершення. Інформативними параметрами є інтенсивність уповільненої флуоресценції та час її згасання, значення яких залежить від концентрації первинних продуктів фотосинтезу, а значить, і від стану апарату фотосинтезу.

ВИСНОВКИ

Оптичні ефекти, які супроводжують процес фотосинтезу, дозволяють ефективно проводити діагностику фізіологічного стану вищих рослинних організмів, виявляючи порушення у їх розвитку та життєдіяльності на самих ранніх стадіях.

Найбільшу точність та достовірність у діагностиці та оцінюванні фізіологічного стану може надати флюорометричний аналіз, спрямований на дослідження параметрів флуоресценції, яка напряму пов'язана з процесами фотосинтезу.

Удосконалення технічних засобів для аналізу стану рослинних організмів за методами флюорометричного аналізу повинно відбуватися у напряму усунення впливу на результати вимірювань зовнішньої освітленості, що дозволить ефективно використовувати їх у польових умовах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – №4. – С. 7-13.
2. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга // Технология живых систем. – 2005, Т.2. - С. 47–68.
3. Мерзляк М.Н., Погосян С.И. Использование спектроскопии отражения в анализе пигментов высших растений // Физиология растений. – 2003. – №5. – С. 785-792.
4. Будаговсикй А. В. Парадоксы оптических свойств зеленых клеток и их практическое применение //Фотоника. – 2010. – №6. – С. 22-28.
5. Рубин А.Б. Биофизика. Т2: Биофизика клеточных процессов. – М.: МГУ, 2000. – 467 с.
6. Войтович И.Д., Корсунский В.М. Сенсор для измерения хлорофилла в листьях растений [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.intuit.ru/department/hardware/intsensors/20/3.html.
7. Сурин В. Г., Моисеев К. Г., Рысев М. Н. Экспресс-диагностика состояния растений in situ

фотометрическим методом // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2009. - № 1. - С. 30-32.
8. Патент 13485 України на корисну модель, МПК G01N 21/01. Оптоелектронний сенсор / І.Д. Войтович, О.І Китаєв, П.С. Клочан, В.О. та ін.: Інститут кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України. - u200504997; заявл. 26.05.2005, опубл. 17.04.2006, бюл. № 4/2006.
9. Лакович Дж Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. – М: Мир, 1986. – 496 с.
10. Е.В. Срахан Информационные технологи в прецизионном земледелии // Комп'ютерні засоби, мережі та системи.- 2010. – №9. – С. 82-91.
11. Белов М.Л., Булло О.А., Городничев В.А. Лазерный флуоресцентный метод контроля состояния растений в стрессовых ситуациях //Электронное научно-техническое издание Наука и образование.- 2012, №4. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://technomag.edu.ru/pdf/out/361884.pdf.
12. Лазерная флюориметрия океана [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://dvpu.msun.ru/dvpu/optics/sci2.html.
13. Букин О.А., Салюк П.А., Майор А.Ю., Павлов А.Н. Исследование процессов воспроизводства органического вещества клетками фитопланктона методом лазерной индуцированной флуоресценции // Оптика атмосферы и океана. – 2005. – №11. – С. 976-983.
14. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. – К.: Альтерпрес, 2002.- 190 с
15. Магомедова М.Х.-М., Алиева М.Ю. Флуоресцентная реакция растений на различия в минеральном питании // Известия ДГПУ Естественные и точные науки.- 2010, №3. – С. 60-65
16. Ефремов И.В., Быкова Л.А. Изучение влияния фосфорорганических гербицидов (на примере глифосата) на культурные и сорные растения // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2002. – №3. – С. 90-94.

Надійшла до редакції 17.06.2012р.

ТАРНОВСЬКИЙ М.Г. – к.т.н., доцент, доцент кафедри лазерної та оптоелектронної техніки, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна.

ЯНКОВСЬКИЙ Я.Ю. – студент 3-го курсу кафедри лазерної та оптоелектронної техніки, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна.