

- Trace Amounts of Pesticides in Food, Feed and the Environment. Kiev: Ukraine State Chemical Commission, 1995, Number 22(2):56–61]. Kiev: Ukrkoskhimkomissii, 1995, no. 22(2), pp. 56–61 (*in Russian*).
3. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu azota, nitratov i nitritov v pochvakh, prirodnykh vodakh, kormakh i rasteniyakh [Guidelines for determination of nitrogen, nitrate and nitrite in soils, natural waters, feed and plants]. Moscow, 1984, 68 p. (*in Russian*).
 4. Khavezov Y., Tsalev D. Atomno-absorbtsionnyy analiz [Atomic-absorption analysis]. Lviv: Khimiya, 1983, 144 p. (*in Ukrainian*).
 5. Sanitarnye pravila i normy okhrany poverkhnostnykh vod ot zagryazneniya [Sanitary rules and norms of surface waters protection from pollution]. SanPiN no. 4630-88. Moscow: Ministerstvo zdruvookhraneniya SSSR, 62 p. (*in Russian*).
 6. Voronkov N.A. Ekolohiia zahalna, sotsialna, prykladna: Pidruchnyk dlia studentiv vyshchykh navchalnykh zakladiv. Posibnyk dlia vchyteliv [General, social and applied ecology: Textbook for students of high school. The teacher's guide]. Moscow: Lhar., 1999, 424 p. (*in Ukrainian*).

УДК 537.85:581.132.1: 351.777.6

ІНДУКЦІЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ В ЛИСТКАХ КУКУРУДЗИ ЗА УМОВ ЗАБРУДНЕННЯ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ

С.Г. Корсун¹, В.В. Груша², Н.І. Довбаш¹

¹ Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН»

² Інститут садівництва НААН

Встановлено, що сучасним інформативним методом визначення впливу важких металів на фізіологічний стан агроценозу кукурудзи без порушення цілісності рослин є фотоіндукція флуоресценції хлорофілу. Зміни у будь-якій ланці фотосинтезу зумовлюють зміни вигляду кривої Каутського, що дає змогу діагностувати стан фотосинтетичного апарату рослин за впливу ВМ на момент вивчення. Відзначено відмінності між кривими інтенсивності флуоресценції хлорофілу листків кукурудзи на ділянках контролю і в екотопах, забруднених важкими металами. Визначено, що надмірне накопичення ґрунтом свинцю, цинку, кадмію спричинило порушення у фотосинтетичному апараті листків кукурудзи як у початковій фазі розвитку (3–4 листки), так і в період викидання волоті.

Ключові слова: індукція флуоресценції хлорофілу, ефект Каутського, хлорофіл, кукурудза, важкі метали, екотоп, фотосинтез.

Унаслідок активної антропогенної діяльності значно збільшуються надходження шкідливих речовин до навколишнього природного середовища, що негативно впливає на біотичну складову екосистеми, в т.ч. на рослини. Насамперед несприятливі чинники порушують діяльність фотосинтетичного апарату рослини [1, 2]. Індикатором фізіологічних змін є хлорофіл, локалізований у фотосинтетичних мембранах, який має певні спектральні властивості.

Зміни цих властивостей можна детектувати та реєструвати в режимі реального часу, отримуючи інформацію для експрес-діагностики стану клітин [3, 4].

Одним із сучасних методів діагностування фізіологічного стану рослин, що детально характеризує проходження фотосинтезу, є експрес-метод індукції флуоресценції хлорофілу рослин у червоній ділянці спектра [5]. У первинні процеси фотосинтезу енергія випромінювання поглинається, перетворюючись в енергію хімічних зв'язків. Своєю чергою незасвоєне

хлорофілом світло флуоресціює. Процеси світлової та темної фаз фотосинтезу відображають зміну флуоресценції хлорофілу. Дослідженнями науковців продемонстровано тісний зв'язок індукційних процесів флуоресценції хлорофілу листків з функціонуванням фотосинтетичного апарату і фізіологічного стану рослини залежно від абіотичних чинників [2]. Разом з тим у науковій літературі існує недостатньо інформації стосовно змін у функціонуванні фотосинтетичного апарату за фазами розвитку сільськогосподарських культур в умовах полікомпонентного забруднення ґрунту важкими металами.

Метою роботи було виявлення зміни стану фотосинтетичного апарату рослин кукурудзи *in vivo* за допомогою експресметоду індукції флуоресценції хлорофілу в умовах більшого від природного вмісту важких металів у екотопі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили у рамках стаціонарного дрібноділянкового дослідження «Вплив цинку, свинцю, кадмію на продуктивність сільськогосподарських культур та екотоксикологічні характеристики сірого лісового ґрунту», закладеного 1999 р. у дослідному господарстві «Чабани» ННЦ «Інститут землеробства НААН» (Правобережний Лісостеп, Київська обл.). Ґрунт – сірий лісовий легкосуглинковий. У досліді передбачено варіанти зі штучно створеними фонами свинцю, кадмію, цинку: 1 – природний фон цинку, свинцю і кадмію (контроль); 2 – перевищення природного фону металів у 10 разів, 3 – у 100 разів; 4 – у 5 разів. Об'єктом досліджень був беззмінний упродовж 2012–2014 рр. агроценоз кукурудзи (гібрид Здвиж МВ). Сівбу проводили широкорядним способом, добрива на усіх ділянках вносили навесні під час передпосівного обробітку у дозі $N_{120}P_{90}K_{120}$. Повторність дослідження – чотириразова.

Для вивчення функціональних характеристик фотосинтетичного апарату рослин кукурудзи використали метод індукції

флуоресценції хлорофілу (ІФХ). Параметри флуоресценції хлорофілу визначали в польових умовах (*in vivo*) за допомогою портативного флуорометра «Флоратест», не порушуючи цілісності досліджуваних рослин. Зміни значень виходу флуоресценції на фоні постійного світла реєстрували за трихвилинної темної адаптації. Довжина хвилі освітлення в максимумі становить 450–470 нм. Спектральний діапазон вимірювання флуоресценції – 670–770 нм.

Індукція флуоресценції хлорофілу закономірно змінюється з віком листка рослини, тому для оцінювання впливу важких металів на стан фотосинтезуючого апарату кукурудзи вимірювання проводили окремо у фазі 3–4 листків і у фазі викидання волоті. Для отримання фізіологічно значущих результатів визначали основні кінетичні параметри: F_o – фонові флуоресценція, F_m – максимальний вихід флуоресценції, F_{st} – стаціонарна флуоресценція.

Статистичну обробку даних виконували за використанням стандартних комп'ютерних програм Microsoft Office Excel 2003 і Statistica.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Часова залежність інтенсивності флуоресценції хлорофілу мала характерний вигляд кривої з кількома максимумами, що графічно відображає ефект Каутського (рис. 1). Особливості індукції флуоресценції хлорофілу залежать від стану всієї системи фотосинтезу і відображають кінетику перебігу всіх ланок біохімічного ланцюга фотосинтезу.

Зміни у будь-якій ланці фотосинтезу зумовлюють зміни вигляду кривої, що дає змогу діагностувати поточний стан фотосинтетичного апарату рослин за впливу стресових чинників.

Оскільки в досліді основні абіотичні чинники – температура, вологість, освітлення, мінеральне живлення були однаковими для усіх варіантів, то забруднення екотопу важкими металами лишалось основним, що могло змінювати традиційну для фаз розвитку рослин кукурудзи флуоресценцію хлорофілу.

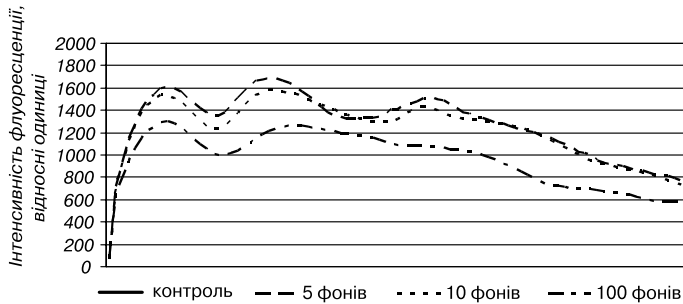


Рис. 1. Криві індукції флуоресценції хлорофілу листків кукурудзи у фазі викидання волоті залежно від фону забрудненості агроєкоотопу важкими металами

У ході досліджу зафіксовано різницю між кривими інтенсивності флуоресценції хлорофілу листків кукурудзи з ділянок контролю та рослин, вирощених у екотопах, що забруднені важкими металами (ВМ). Особливості формування кривих визначаються основними кінетичними параметрами, пов'язаними з діяльністю фотосинтетичного апарату. У фазі викидання волоті крива Каутського, отримана у варіанті з 100-разовим перевищенням фону, мала значно меншу амплітуду піків порівняно з іншими.

Флуоресценцію хлорофілу, що збуджена слабким світлом за відкритих реакційних центрів після адаптування до темряви, позначають F_0 . Цей рівень флуоресценції

залежить від втрат енергії збудження під час міграції пігментною матрицею, а також від умісту молекул хлорофілу, що не мають функціонального зв'язку з реакційними центрами, тобто не беруть участі у процесах фотосинтезу. Як правило, за відповідних для культури абіотичних умов величина F_0 є незначною порівняно з іншими ділянками кривої ІФХ, що обумовлено активним використанням клітинами енергії поглиненого світла. У нашому досліді значення параметра на етапі формування рослинами 3–4 листків змінювались від 608 до 667 відносних одиниць (в.о.). Рослини ділянок з надприродним умістом ВМ мали на 7–8% нижчий фоновий рівень флуоресценції порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1

Зміна параметрів флуоресценції хлорофілу листків кукурудзи у умовах забруднення ґрунту цинком, свинцем, кадмієм

Показник	Контроль	5 фонів	10 фонів	100 фонів
<i>Фаза розвитку – 3–4 листки</i>				
F_0	666,7	612	608	616
F_m	810,7	712	668	696
F_v	144,0	100,0	60,0	80,0
F_v / F_m	0,18	0,14	0,09	0,11
$F_m - F_{st} / F_{st}$	0,77	0,52	0,44	0,53
<i>Фаза розвитку – викидання волоті</i>				
F_0	874,7	933,3	933,3	796
F_m	1781,3	1685,3	1584,0	1236
F_v	906,7	752,0	650,7	440,0
F_v / F_m	0,51	0,45	0,41	0,36
$F_m - F_{st} / F_{st}$	1,35	1,17	1,15	1,11

Але це зумовлено не ростом активності використання клітинами поглиненого світла, а порушенням у фотосинтетичному апараті, спричиненим блокуванням міді та магнію в умовах високого вмісту свинцю, кадмію, цинку у живильному середовищі [6]. Аналіз даних у фазі викидання волоті підтверджує вищевказаний висновок. На ділянках з 5 і 10 фонами ВМ реакційні центри мали нижчу активність, і тому рівень флуоресценції F_o порівняно з контролем підвищувався на 7%. А у варіанті зі 100 фонами стан рослин залишався пригніченим і рівень F_o був на 9% нижчим від контролю.

Порушення у діяльності фотосинтетичного апарату в умовах забруднення екотопів ВМ підтверджується іншими показниками індукційних процесів флуоресценції хлорофілу. Параметр F_m характеризує найвищий рівень флуоресценції хлорофілу, що реєструється у вигляді максимуму на індукційній кривій. У цій точці фотосинтез відповідає мінімальному рівню, а його значення залежить від динамічного зрівноваження між процесами флуоресценції, фотохімії та теплової дисипації. У фазі 3–4 листків він становив 810,7 – на контролі і 668–712 – у екотопах, забруднених ВМ. За максимального розвитку фотосинтезуючого апарату рослин кукурудзи (у фазі викидання волоті) F_m змінювався у межах 1236–1685 в.о. на забруднених фонах при 1781 у контрольному варіанті. Цей показник найбільш варіабельний серед інших, що зумовлено адаптивними змінами в структурі пігментного комплексу.

Для оцінювання індукції флуоресценції хлорофілоносних тканин використовують розрахунковий параметр F_v – змінну флуоресценції хлорофілу, що виражається як різниця показника найвищого рівня флуоресценції і фонової флуоресценції ($F_m - F_o$), інформуючи про величину амплітуди змін кривої Каутського. Виявлено, що у фазу 3–4 листків рівень F_v на забруднених ділянках знижувався порівняно з контролем на 31–58%, що свідчить про значне пригнічення фотосинтетичного апарату листя кукурудзи під впливом стресора на початковому етапі розвитку рослин. Така

залежність збереглась і на момент викидання волоті. Показник F_v у варіантах з ВМ поступався контролю на 17–51%. З підвищенням вмісту ВМ у ґрунті амплітуда змін у кривих Каутського спадала.

Максимальну ефективність первинних процесів фотосинтезу, що залежать від фізіологічного стану рослини, характеризує параметр F_v / F_m . Наукові публікації свідчать, що ефективність фотосинтезу, як і цей параметр, залежить від інтенсивності впливу абіотичних чинників, у т.ч. полютантів [7, 8]. Максимально можлива величина співвідношення F_v / F_m для функціонуючих хлоропластів листків теоретично рівна 0,82. За задовільного для рослин впливу абіотичних чинників їхній фізіологічний стан забезпечує флуоресценція листків, відносна змінна якої наближається до 0,80. Отримані нами дані демонструють пригнічення фотосинтетичної активності у рослин кукурудзи у фазі 3–4 листків на усіх досліджуваних ділянках, оскільки значення F_v / F_m було в межах 0,09–0,18. Більшого розвитку фотосинтетична активність хлоропластів досягла у фазі викидання волоті. Про це свідчить значення параметра F_v / F_m , що змінювалось в межах 0,36–0,51 залежно від концентрації полютантів у екотопі. Для обох фаз розвитку рослин кукурудзи найвищий показник відносної змінної флуоресценції листків відзначено на ділянках з природним фоном ВМ. Забруднення ґрунту знижувало ефективність первинних процесів фотосинтезу.

Спадання флуоресценції від F_m до F_{st} супроводжується зростанням інтенсивності фотосинтезу за активізації ферменту рибульозабіфостфат карбоксилаза. Оцінювання ефективності циклу Кальвіна проводять за параметром $(F_m - F_{st}) / F_{st}$, який називають Rubisco-мірами [3, 9]. У досліджених рослин кукурудзи цей коефіцієнт був найвищим у фазі піку фізіологічного розвитку рослин – викидання волоті – 1,11–1,35. Натомість на початкових етапах розвитку рослин кукурудзи – фаза 3–4 листків, ефективність циклу Кальвіна мала удвічі нижчі значення. Загалом, базуючись на показниках F_m і F_{st} та розрахунковому параметрі $(F_m - F_{st}) / F_{st}$, що визначають форму

спадної частини кривої Каутського, можна стверджувати, що активізація та налагодження реакцій циклу Кальвіна й потоків речовин через мембрани та судинами листків були ефективнішими у рослин кукурудзи на ділянках, не забруднених ВМ.

Ймовірно, токсичність ВМ, що проявилась у зміні параметрів кривої Каутського, полягала у порушенні природного надходження елементів до рослинного організму. Слід відзначити антагоністичну взаємодію цинку і міді, що полягає у їх конкуренції за надходження до кореневої системи [6]. Фітотоксичність кадмію зумовлено порушенням ензиматичної активності. Вважають, що кадмій пригнічує процес утворення пігментів хлорофілу і антоціану листків, а хлорофіл має здатність до концентрування кадмію [10, 11]. Науковцями запропоновано використовувати стан активності хлорофілу як індикатора для визначення верхнього критичного рівня накопичення кадмію в рослинах [12]. Свинець спричиняє порушення реакцій переносу електронів, що супроводжується пригніченням процесів фотосинтезу. Стимулююча дія свинцю на надходження до рослин кадмію

є додатковим важелем зниження ефективності процесу фотосинтезу у кукурудзи.

ВИСНОВКИ

Сучасним інформативним методом визначення впливу ВМ на фізіологічний стан агроценозу кукурудзи без порушення цілісності рослин є фотоіндукція флуоресценції хлорофілу. Основні параметри індукційної кривої Каутського характеризують фотосинтетичні процеси у хлоропластах, зумовлені впливом середовища на перебіг як світлових, так і темнових їх фаз, і свідчать про стійкість рослин до дії несприятливих чинників у техногенно сформованих едафотобах.

Вищий від природного вміст у ґрунті свинцю, цинку, кадмію спричинив порушення стану фотосинтетичного апарату листків кукурудзи як у початковій фазі розвитку (3–4 листки), так і в період викидання волоті. Величини ключових параметрів: фонові флуоресценції (F_o), максимального виходу флуоресценції (F_m), стаціонарної флуоресценції (F_{st}) свідчать про зниження ефективності первинних процесів фотосинтезу та порушення злагодженості реакцій циклу Кальвіна.

ЛІТЕРАТУРА

1. Корнеев Д.Ю. Изучение QB-восстанавливающих комплексов фотосистемы 2 с помощью индукции флуоресценции хлорофилла / Д.Ю. Корнеев, С.М. Кочубей // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т. 32, № 1. – С. 20–24.
2. Карапетян Н.В. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений / Н.В. Карапетян, Н.Г. Бухов // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 5. – С. 1013–1026.
3. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д.Ю. Корнеев. – К.: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
4. Butler W.L. Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer / W.L. Butler; ed. by A. Trebst, M. Avron // Encyclopedia of Plant Physiology. – 1977. – Vol. 5. – P. 149–167.
5. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу: Методичні вказівки для студентів біологічного факультету / О.В. Брайон, Д.Ю. Корнеев, О.О. Снегур, О.І. Китаєв. – К.: Видавничо-поліграфічний центр Київського університету, 2000. – 15 с.
6. Кабата-Пендиас А. Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М.: Мир, 1989. – 440 с.
7. Нестеренко Т.В. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям / Т.В. Нестеренко, А.А. Тихомиров, В.Н. Шихов // Журн. общ. биологии. – 2007. – Т. 68, № 6. – С. 444–458.
8. Loreto F. Analysis of stress status through natural fluorescent probes in intact aves / F. Loreto, G. Bongioanni // AgRh. mediter. – 1988. – Vol. 118, no. 4. – P. 344–353.
9. Lichtenthaler H.K. The Kautsky effect 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics / H.K. Lichtenthaler // Photosynthetica. – 1992. – Vol. 27, no. 1–2. – P. 45–55.
10. Cunningham L.M. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity in soybean / L.M. Cunningham, F.W. Collins, T.C. Hutchinson // Conf. on Heavy Metals in the Environment (Toronto, 1975, October 27) – Toronto, 1975. – P. 97.
11. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants / T. Baszynski, L. Wajda, A.T. Krol et al. // Physiol. Plant. – 1980. – Vol. 4. – P. 365.
12. Burton K.W. Chlorophyll as an indicator of the upper critical tissue concentration of cadmium in plants / K.W. Burton, J.B. King, L. Morgan // Water Air Soil Pollut. – 1986. – Vol. 27. – P. 147.

REFERENCES

1. *Korneev D.Y.* (2000). Izuchenie QV vosstanavlivayushchikh kompleksov fotosistemy 2 s pomoshchyu induktsii fluorestsentsii khlorofilla [Studying QB – reducing complexes of photosystem 2 using induction of chlorophyll fluorescence]. *Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], vol. 32, no. 1, pp. 20–24 (*in Russian*).
2. *Karapetyan N.V.* (1986). Peremennaya fluorestsentsiya khlorofilla kak pokazatel fiziologicheskogo sostoyaniya rasteniy [Variable chlorophyll fluorescence as an indicator of physiological state of plants]. *Fiziologiya rasteniy* [Plant Physiology], vol. 33, no. 5, pp. 1013–1026 (*in Russian*).
3. *Korneev D.Y.* (2002). Informatsionnye vozmozhnosti metoda induktsii fluorestsentsii khlorofilla [Information possibilities of the method of chlorophyll fluorescence induction]. Kyiv: Alterpres, 188 p. (*in Russian*).
4. *Butler W., Trebst A., Avron M.* (1997). Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer. *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 5, pp. 149–167 (*in English*).
5. *Brayon A.V., Korneyev D.Yu., O.O. Snehur, Kitaev A.I.* (2000). Instrumental'ne vyvchennja fotosyntetichnogho aparatu za dopomoghoju induktsiji fljuorescenciji khlorofilu: Metodychni vkazivky dlja studentiv biologichnogho fakul'tetu [Instrumental study of photosynthetic apparatus by induction method of chlorophyll fluorescence: guidance for students of biological faculty]. Kyiv: Vydavnycho-polihrafichnyi tsentr Kyivskoho universytetu, 15 p. (*in Ukrainian*).
6. *Kabata-Pendias A.* (1989). Mikroelementy v pochvakh i rasteniyakh [Trace elements in soils and plants]. Moscow: Mir, 440 p. (*in Russian*).
7. *Nesterenko T.V., Tikhomirov A.A., Shikhov V.N.* (2007). Induktsiya fluorestsentsii lorofilla i otsenka ustoychivosti rasteniy k neblagopriyatnym vozdeystviyam [Induction of fluorescence lorofilla and evaluation of plant resistance towards adverse effects]. *Zhurn. obshch. biologii*, Vol. 68, no. 6, pp. 444–458 (*in Russian*).
8. *Loreto F., Bonghi G.* (1988). Analysis of stress status through natural fluorescent probes in intact aves. *AgRh. mediter*, Vol. 118, no. 4, pp. 344–353 (*in English*).
9. *Lichtenthaler H.K.* (1992). The Kautsky effect 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica*, Vol. 27, no. 1–2, pp. 45–55 (*in English*).
10. *Cunningham L.M., Collins F.W., Hutchinson T.C.* Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity in soybean. Conf. on Heavy Metals in the Environment (Toronto, October 27 1975), 1975, p. 97 (*in English*).
11. *Baszynski T., Wajda L., Krol A., Wolinska D., Krupa Z., Tukendorf L.* (1980). Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant*. Vol. 4, p. 365 (*in English*).
12. *Burton K., King J., Morgan L.* (1986). Chlorophyll as an indicator of the upper critical tissue concentration of cadmium in plants, *Water Air Soil Pollut*, vol. 27, 1986, p. 147 (*in English*).

НОВИНИ

На Сквирській дослідній станції органічного виробництва Інституту агроекології і природокористування НААН 16 червня відбувся **День органічного поля**.

На заході було продемонстровано вирощування різних сортів та гібридів сільськогосподарських культур в органічному виробництві (соя, озима пшениця, кукурудза, овочі, сидерати та ін.).

Відвідувачі ознайомились з ефективністю застосування мікробіологічних препаратів різних виробників, дозволених в органічному виробництві та сучасним обладнанням, призначеним для використання в органічному землеробстві, сітчаста борона Striegel (Німеччина).

Торальф Ріхтер – експерт напрямку сільськогосподарських орних культур (FiBL, Швейцарія) представив доповідь про джерела постачання азоту та їх наслідки для складання сівозміни в органічному виробництві сільськогосподарських культур.