

Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова»,
Україна

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ІНДУКЦІЇ ФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ ЛИСТКІВ ДЛЯ ОЦІНКИ ПОСУХОСТІЙКОСТІ ВІНОГРАДУ В УМОВАХ *IN VITRO*

*Наведені результати досліджень індукції флуоресценції хлорофілу листків підщеп винограду під впливом штучної посухи в умовах *in vitro*. Для створення посухи до поживного середовища Мурасіге-Скуга додавали осмотичну речовину поліетиленгліколь. На основі зміни амплітуди та максимуму флуоресценції зроблено висновок про посухостійкість підщеп.*

Ключові слова: мікроклони, підщепні сорти, поліетиленгліколь, флуоресценція хлорофілу.

Виноград – пластична культура, яка з-поміж інших плодових добре адаптується до несприятливих умов довкілля та позитивно реагує на будь-які заходи, що здійснюються для послаблення стресового впливу. Для винограду ступінь стійкості сорту до екстремальних умов, здатність протидіяти їм часто характеризують за зміною агробіологічних та фізіолого-біохімічних показників, зокрема таких, які вказують на фотосинтетичну активність [3, 9]. Одним з методів, який дозволяє оцінити стан роботи фотосинтетичного апарату в стресових умовах є метод індукції флуоресценції хлорофілу листків (ІФХ). У його основі лежить процес перетворення квантової енергії, отриманої листком рослини, у фотохімічну енергію, теплову дисипацію і флуоресценцію, які є конкурентними процесами до фотосинтезу [5]. Метод має численні переваги – це інформативність, експресність, висока чутливість та збереження нативності зразка [4]. На сьогодні встановлено доцільність застосування методу ІФХ у виноградарстві для досліджень вологозабезпечення виноградного куща та корекції на цій основі режиму зрошування ґрунту [9], а також для визначення стійкості рослин до екстремальних факторів середовища [3]. Однак, оцінка стійкості винограду в умовах польових або вегетаційних досліджень не завжди зручна, тому що потребує значних затрат часу та виконання трудомістких робіт. Експрес-методи оцінки рослин до стресового впливу в умовах *in vitro* дедалі частіше розглядають як біотехнологічну альтернативу традиційним селекційним та фізіологічним дослідженням [6].

Метою наших досліджень було вивчення індукції флуоресценції хлорофілу листків мікроклонів винограду підщепних сортів в умовах осмотичного стресу *in vitro* та оцінка їх посухостійкості.

Матеріали та методи досліджень. Роботу виконували у відділі розсадництва та розмноження винограду ННЦ „ІВіВ ім. В. Є. Таїрова”. Дослідження проводили на мікроклонах винограду інтродукованого підщепного сорту Берландієрі × Рипарія Кречунел 2 та підщепях селекції ННЦ “ІВіВ ім. В.Є. Таїрова” Добриня та Таїровський 1, які вирощували на поживному середовищі Мурасіге-Скуга (МС). Умови ґрунтової посухи створювали шляхом додавання в середовище МС осмотично-активної речовини - поліетиленгліколю (ПЕГ) у кількості від 1% до 8%. Мікроклони контрольних варіантів культивували на стандартному поживному середовищі МС. На стресове середовище пересаджували рослини з добре розвинутою вегетативною масою і кореневою системою.

На 7-8-й день досліджень проводили обліки біометричних показників росту рослин, а також визначали індукцію флуоресценції хлорофілу листків мікроклонів (за допомогою портативного хронофлуорометру «Флоратест») [1]. Флуоресценцію вимірювали протягом 3 хв., у результаті отримано 90 значень для кожного виміру, за якими будували графік. Також у ході досліджень визначали такі показники: F_v – змінна флуоресценція хлорофілу, відн. од.; $K1$ – індикаторний показник впливу екзогенних факторів, який характеризує первинну продуктивність фотосинтезу, %; $K2$ – коефіцієнт індукції флуоресценції – індикаторний показник квантового виходу флуоресценції, %; Q_y – кількість невідновлюючих фотосистему II комплексів, %; F_{max} – максимальне значення флуоресценції хлорофілу, відн. од. [4].

Результати. У ході досліджень визначено, що при внесенні ПЕГ у поживне середовище у мікроклонів починали проявлятися морфологічні зміни, які можна оцінювати як відповідь рослин на дію стресора; відзначено суттєвий вплив на ростові процеси високих концентрацій ПЕГ. Оцінюючи вплив посухи на підщепи винограду виявили, що низькі концентрації осмотично-активної речовини – 1-3% - призводили до сповільнення росту стебла та незначного зменшення кількості листків порівняно з початковими даними. Натомість, у варіантах з вищою концентрацією ПЕГ було відмічено спочатку

пригнічення росту, а потім істотне зменшення висоти стебла та кількості листків за рахунок усихання. Контрольні рослини, навпаки, відрізнялися збільшенням цих показників, що свідчить про продовження активних ростових процесів [2].

Вимірювання флуоресценції хлорофілу листків рослин, які культивували на стресових середовищах показало, що амплітуда ІФХ змінювалась порівняно з контролем. Так, у сорту Кречунел 2 найбільш помітні зміни кривих ІФХ були після культивування на середовищах з 5, 6 та 7% ПЕГ (Рис. 1). Графік контрольного варіанту займав проміжне положення, досягаючи максимального значення 1,0417 відн. од. Для варіанту 5% ПЕГ був характерним підйом кінетичної кривої на вищий від контролю рівень з максимумом 1,1108 відн. од. Підвищення концентрації ПЕГ до 6 та 7% призводило до деякого спаду інтенсивності ІФХ, F_{\max} становило відповідно 0,9830 та 0,9570 відн. од. Що стосується сорту Добриня (Рис. 2), то на вищому, ніж контроль, рівні знаходились криві ІФХ варіантів 5-7% ПЕГ. У цих варіантах максимальна величина флуоресценції складала 1,0952-1,1130 відн. од., що перевищувало контрольні значення на 6,3-8,0%. На нижчому кінетичному рівні знаходився графік варіанту 8% ПЕГ, де F_{\max} дорівнювало 0,9244 відн. од. У підщепи Таїровський 1 (Рис. 2), як і у сорту Добриня, на найвищому рівні знаходилася крива 5% ПЕГ, за ним слідував графік контрольного варіанту та варіант 6% ПЕГ, а найменшу інтенсивність флуоресценції хлорофілу зафіксували у варіанті 7% ПЕГ.

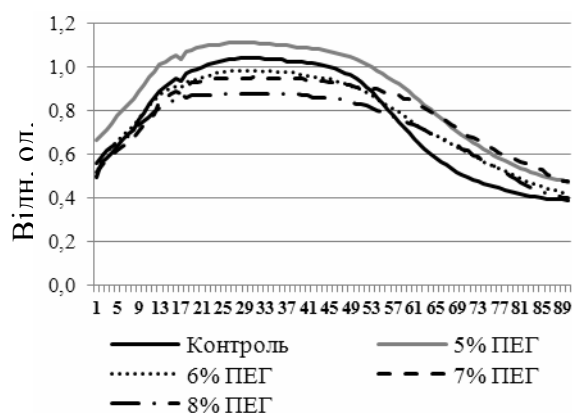


Рис. 1 Зміна флуоресценції хлорофілу листків винограду підщепного сорту БхР Кречунел 2 під впливом штучної посухи

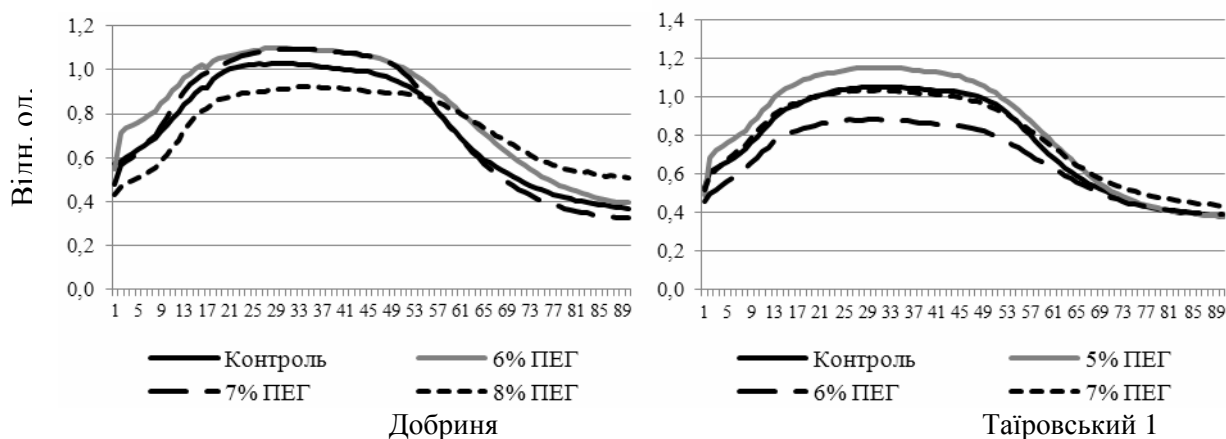


Рис. 2 Зміна флуоресценції хлорофілу листків підщеп винограду під впливом штучної посухи

Аналіз показників флуоресценції K_1 , K_2 , Q_b та ін. в дослідних та контрольних варіантах підтвердив негативний вплив високих концентрацій ПЕГ на роботу фотосинтетичного апарату (Табл. 1). Показник K_1 , який характеризує первинну продуктивність фотосинтезу, достовірно не змінювався у підщеп Кречунел 2 та Таїровський 1, лише при найбільших концентраціях ПЕГ у середовищі він знижувався. У сорту Добриня у дослідних варіантах 5 та 6% ПЕГ величина K_1 зменшувалась на 3,5-19,1%. Натомість показник K_2 , який визначає квантовий вихід флуоресценції, був меншим у підщеп винограду Кречунел 2 та Таїровський 1, а у сорту Добриня залишався на рівні контролю незалежно від концентрації ПЕГ. У більшості варіантах було помітним збільшення кількості пластохінону Q_b . У мікроклонів сорту Кречунел 2 Q_b достовірно перевищував контроль на 13,2% у варіанті 6% ПЕГ, у сорту Добриня його кількість зростала на

9,7-42,4% у варіантах 4-8% ПЕГ; у Таїровського 1 визначили, що кількість Q_b збільшувалась на 15,9-56,9% ПЕГ.

Отже, на основі спостережень за ростом мікроклонів встановили, що підщепи винограду мають різної сили пошкодження, викликані ПЕГ, і для мікроклонів кожного сорту є певна критична концентрація ПЕГ у середовищі, яка призводить до летальних наслідків. На графіках ІФХ (Рис. 1, 2) це проявлялося у тому, що криві інтенсивності флуоресценції різних дослідних варіантів знаходились на неоднакових кінетичних рівнях. Встановили, що графік ІФХ контрольного варіанту зазвичай займає проміжне положення, на вищому кінетичному рівні знаходяться графіки варіантів з вмістом ПЕГ, що моделюють посуху середньої сили, значно нижче контрольного графіку знаходяться криві ІФХ варіантів, де вміст ПЕГ близький до критичного рівня і спалаху флуоресценції не спостерігають. Так, у підщепи Кречунел 2 спостерігали значне пригнічення росту та всихання стебла мікроклонів та зменшення інтенсивності флуоресценції хлорофілу у варіанті 6% ПЕГ, відповідно критичною для сорту є концентрація 6% ПЕГ. Для підщепи Добриня визначили, що критичною концентрацією ПЕГ є 8%, а для Таїровського 1 – 6-7% ПЕГ (Рис. 2). Згідно з цими даними можна оцінити посухостійкість підщепи Добриня як високу, сорт Таїровський 1 характеризувати як середньостійкий, а Кречунел 2 – як слабкостійкий до впливу посухи. Такі висновки узгоджуються із результатами польових досліджень та літературними даними. Так, підщепний сорт Б.хР. Кречунел 2 є слабкостійким до впливу посухи [7]. Багаторічні спостереження за ростом та розвитком винограду сорту Добриня дозволяють характеризувати його як досить стійкий до дефіциту води [8]. Таким чином, на основі виконаних досліджень можна зробити висновок про достовірність отриманих результатів та можливість застосування методу ІФХ для оцінки посухостійкості винограду.

Таблиця 1

Показники флуоресценції хлорофілу листків мікроклонів винограду підщепних сортів за впливу штучної посухи

Варіант	K1, %	K2, %	Q_b , %	F_v , відн. од.	F_{max} , відн. од.
Кречунел 2					
Контроль	43,75±5,66	66,25±1,41	38,20±1,41	0,5453	1,0417
4% ПЕГ	42,00±3,12	60,12±1,18*	36,25±1,26	0,5348	1,0659
5% ПЕГ	42,50±1,84	60,52±1,40*	36,28±0,91*	0,4442	1,1108
6% ПЕГ	41,00±4,95	59,50±1,42*	43,25±0,58*	0,4817	0,9830
7% ПЕГ	44,67±2,83	59,17±2,12*	32,31±0,98	0,4394	0,9570
8% ПЕГ	43,13±1,94	60,63±1,94*	39,40±1,07	0,3223	0,8789
Добриня					
Контроль	43,25±2,47	56,15±6,86	33,57±1,66	0,4590	1,0303
4% ПЕГ	44,00±2,83	55,69±4,56	36,84±2,53*	0,5023	1,0819
5% ПЕГ	41,75±3,18	58,50±2,12	47,37±2,14*	0,5466	1,1130
6% ПЕГ	35,00±1,41*	60,88±7,60	35,09±1,78	0,5485	1,0987
7% ПЕГ	40,50±0,71	61,38±4,07	40,42±1,54*	0,6181	1,0952
8% ПЕГ	41,00±1,41	59,83±0,24	38,39±1,56*	0,4942	0,9244
Таїровський 1					
Контроль	42,15±1,48	72,25±1,06	21,98±1,59	0,5195	1,0532
4% ПЕГ	41,72±1,85	55,00±1,41*	25,47±1,90	0,6049	1,1023
5% ПЕГ	45,35±3,04	62,75±1,77	26,19±1,09*	0,6626	1,1537
6% ПЕГ	46,88±1,24	56,50±2,83*	44,50±1,78*	0,4214	0,8832
7% ПЕГ	40,38±6,31	69,00±1,41	32,05±1,62*	0,5154	1,0363
8% ПЕГ	39,75±1,06	48,75±6,01*	21,63±0,98	0,5049	1,0195

Примітки: * - різниця з контролем достовірна.

Література

1. Брайон О. В. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу: методичні вказівки для студентів біол. факультету / О. В. Брайон, Д. Ю. Корнеєв, О. О. Снегур, О. І. Китаєв. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2000. – 15 с.
2. Зеленьянська Н. М. Оцінка впливу посухи на ріст винограду в умовах культури тканин *in vitro* / Н. М. Зеленьянська, О. І. Ковбасюк // Інноваційні технології в розвитку столового виноградарства: матеріали між. научно-практ. конф. молодих учених і спец. - Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. В. Е. Таїрова», 2011.-С.33-37.
3. Зеленьянська Н. М. Флуоресценція хлорофілу та водний режим листків саджанців винограду / Н. М. Зеленьянська, Є. В. Сарахан, Н. В. Тулінова // Вісник аграрної науки.-2008 – №9. – с. 25-27.
4. Корнеєв Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д. Ю. Корнеєв. – К.: Альтерпресс, 2002. – 188 с.
5. Рубин А. Б. Первичные процессы фотосинтеза / А. Б. Рубин // Сорровский образовательный журнал. – 1997. - №10. – С. 79-84.
6. Сельскохозяйственная биотехнология / [под ред. Шевелухи В.С.].-2-е изд. перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. – 496 с.
7. Сорта винограда / под ред. Е. Н. Докучаевой / – К.: Урожай, 1986. – 272 с.
8. Тулаева М. И. Формирование нового генофонда винограда Украины устойчивых против стрессовых факторов среды / М. И. Тулаева, М. Г. Банковская, Л. В. Герус и др. // Мобилизация и сохранение генетических ресурсов винограда, современных методов селекционного процесса: материалы между. научно-практ. конф. 13-14 августа 2008 г. – Новочеркасск, 2008. – С. 36-42.
9. Шерер В. О. Використання інформаційних технологій в виноградарстві / В. О. Шерер, В. О. Романов, Є. В. Сарахан, О. Є. Тетьоркіна // Перспективи розвитку виноградарства і виноделія в країнах СНГ: тез. докл. між. научн.-практ. конф., посв. 180-літтю НІВіВ «Магарач». – Ялта, 2008. – С. 46-47.

Гоголинская Е.И.

Применение метода индукции флуоресценции хлорофилла листьев для оценки засухоустойчивости винограда в условиях *in vitro*

Приведены результаты исследований индукции флуоресценции хлорофилла листьев подвойных сортов винограда в условиях засухи in vitro. Для создания условий засухи в питательную среду Мурасиге-Скуга добавляли осмотическое вещество полиэтиленгликоль. На основании изменений амплитуды и максимума флуоресценции сделан вывод о засухоустойчивости подвоев.

Ключевые слова: микроклоны, подвойные сорта, полиэтиленгликоль, флуоресценция хлорофилла.

O.I. Gogulinska

The application of the Method of Induce Fluorescence of Leaves Chlorophyll to Determine Drought Resistance of Grape *in vitro*

The results of the research of fluorescence induce of grape rootstock leaves chlorophyll in vitro conditions have been presented. PEG osmotic substance has been manured to Murasige&Scuga nutrient medium to create artificial drought. Drought resistance of grape rootstock has been determinated on the basis of changes of variable fluorescence and maximum of fluorescence.

Key words: microclones, rootstock varieties, polyethyleneglycole, fluorescence of chlorophyll.