

УДК 62:535.8:634

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ КОМБИНИРОВАННОГО
ОПТИЧЕСКОГО ПРИБОРА ДЛЯ ОЦЕНКИ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОГО
СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА ЗА ОДИН ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЙ
ЦИКЛ**

Ольга Николаевна Будаговская

доктор технических наук, в.н.с.

budagovsky@mail.ru

Федеральный Научный Центр имени И.В.Мичурина
Мичуринский государственный аграрный университет
г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Приведены данные испытаний оптического прибора для комплексной оценки функционального состояния растений по критериям фотосинтетической активности и относительного содержания хлорофилла за один измерительный цикл.

Ключевые слова: фотосинтетическая активность, относительное содержание хлорофилла, листья, комбинированный прибор, макетный образец, испытания.

В работе [1] приведено описание конструкции макетного образца комбинированного прибора, совмещающего функции оценки фотосинтетической активности и относительного содержания хлорофилла. Целью данной работы является испытания работоспособности прибора.

Первый этап испытаний - сравнение показаний прибора с данными по концентрации хлорофилла, полученные стандартным биохимическим способом. Для реализации этого блока испытаний были использованы листья смородины черной сорта «Белорусская Сладкая», визуально отличающиеся по цвету: темно-зеленые, светло-зеленые и желтеющие. После часовой темновой и температурной адаптации были проведены измерения интенсивности светопропускания на комбинированной приборе. Затем через 12 часов после хранения в холодильнике при температуре +2°C из них стандартным биохимическим методом были получены ацетоновые вытяжки хлорофилла и проведено спектрометрирование оптической плотности на 3 длинах волн с использованием спектрофотометра Genesis 10uv Thermo (США). Весь блок биохимических анализов проводился под руководством и при непосредственном участии д.с.х.н. Жбановой Е. В. с использованием указаний методического руководства Казанского университета [2]. Из центральной части листа выбирали кусочки без крупных жилок, формировали навеску 100 мг. Затем растирали ее в фарфоровой ступке в 100% ацетоне и процеживали через стеклянный фильтр с откачкой. Далее доводили объем полученной вытяжки до 10 мл, разливали в кварцевые кюветы и проводили измерение оптической плотности на трех длинах волн: 662 нм, 644 нм и 440 нм (рис.1). Для расчета содержания хлорофиллов и каротиноидов использовали уравнение Хольма-Веттштейна [1]:

$$C_{\text{хл.}a} = 9,784 D_{662} - 0,990 D_{644}$$

$$C_{\text{хл.}b} = 21,426 D_{644} - 4,650 D_{662} \quad (1)$$

$$C_{\text{хл.}a+b} = 5,134 D_{662} + 20,436 D_{644}$$

$$C_{\text{кар}} = 4,695 D_{440,5} - 0,268 C_{\text{хл.}a+b}$$

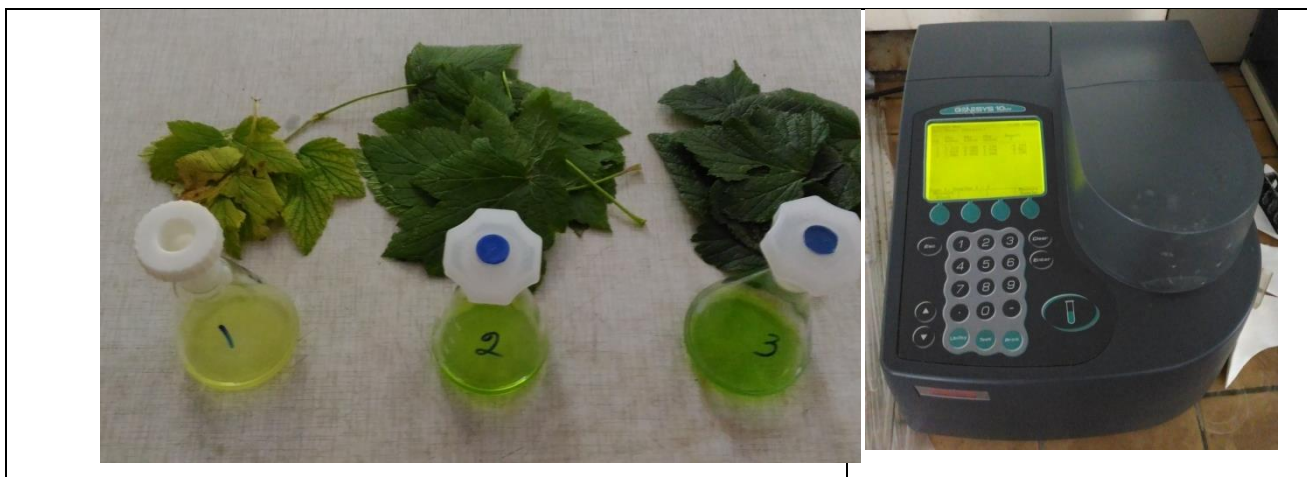


Рисунок 1 – Ацетоновые вытяжки и фотометр для измерения их оптических плотностей

Следует отметить высокий коэффициент корреляции между концентрацией хлорофилла и оптическими параметрами целой листовой пластинки (более 0,997) но о ней с уверенностью можно говорить только в рамках полученных концентраций (в случае суммы хлорофиллов речь идет о диапазоне концентрации от 0,15 % до 0,32 % сырой массы листа (табл.1)). Актуально знать, сохраниться ли данная закономерность, если содержание пигментов будет иным? Для этого удобнее использовать не живые листья, а стандартный раствор Гетри, имитирующий оптические свойства хлорофилла. Его удобно разбавлять в кратных пропорциях и строить на этой основе калибровочные графики в широком диапазоне концентраций.

Таблица 1

Оптические и биохимические параметры листьев смородины

Тип листьев	I, усл.ед.	K проп, %	C хл.а, % с.м.	C хл.б % с.м	C хл.а+б % с.м.	C карат. % с.м
Желтый	130,2±1,2	31,21±0,3	0,0642	0,084	0,148	0,02
Светло-зеленый	82,5±0,58	19,77±0,14	0,1534	0,096	0,248	0,052
Зеленый	62,6±0,95	15,02±0,23	0,2158	0,106	0,322	0,076

Второй этап испытаний – градуировка прибора с использованием стандартного раствора Гетри. Стандартный раствор Гетри по оптической плотности в диапазоне длин волн от 610 нм до 700 нм соответствует раствору водорастворимых производных хлорофилла с концентрацией 85 мг/дм³. Путем разбавления можно получить любую необходимую концентрацию и провести градуировку прибора в широком диапазоне содержания хлорофилла. Приготовление раствора Гетри проводили по методике, описанной в ГОСТ 21802-84 [3].

Полученный раствор наливали в кюветы с плоско-параллельными стенками объемом 1,6 мл. Кювета помещалась между красным излучателем и входной апертурой прибора таким образом, чтобы оптический центр излучателя был в зоне геометрического центра кюветы (рис.2).

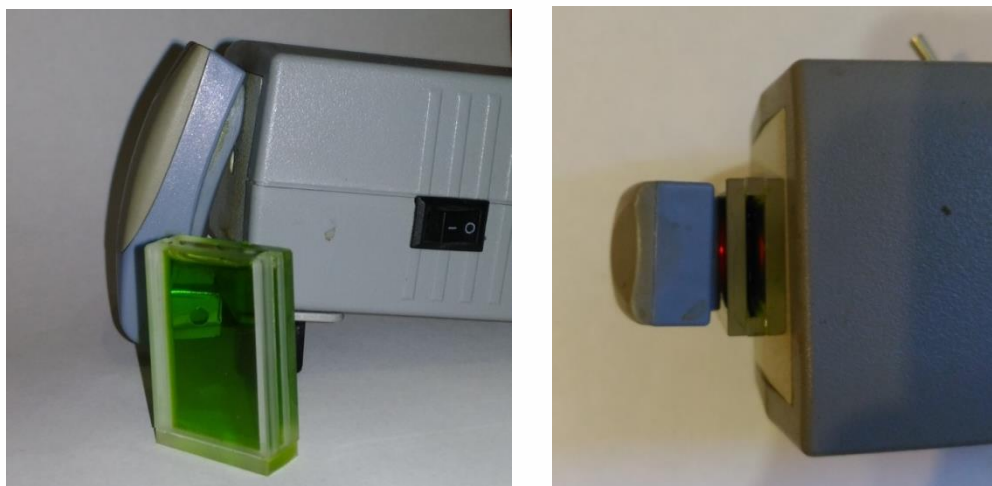


Рисунок 2 - Градуировка прибора с помощью раствора Гетри

Разбавление осуществляли водой, и на каждой заданной концентрации проводили измерения интенсивности прошедшего через кювету в 6 повторностях. В качестве значения нулевой концентрации брали показания прибора при введении в оптический тракт кюветы с дистиллированной водой. Полученная градуировочная кривая показывает возможность оптической оценки относительного содержания хлорофилла во всем возможном диапазоне его концентрации (рис.3).

Третий этап испытаний - режим комплексной диагностики. Возможно несколько вариантов изменения функционального статуса листьев (ФС): 1 - изменение содержание хлорофилла с сохранением удельной фотосинтетической активности (например, процессы осенней деградации хлорофилла), 2 - изменения фотосинтетической активности на фоне сохранения концентрации хлорофилла и 3 – меняются оба показателя – и концентрация хлорофилла и фотосинтетическая активность. Следует оценить все возможные алгоритмы обработки данных выбрать такие, которые будут одинаково успешны для всех трех случаев.

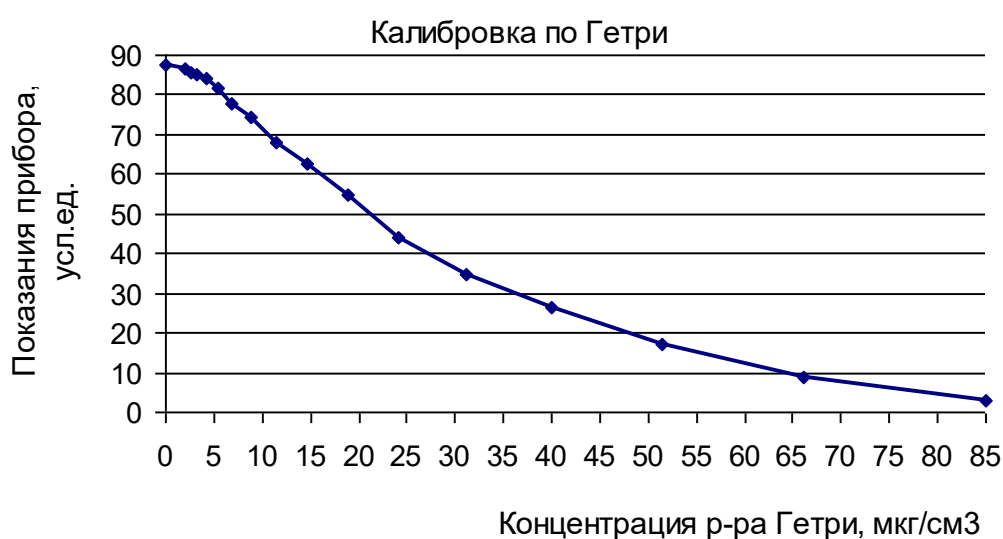


Рисунок 3 - Градуировочная кривая связи показаний прибора и концентрации раствора Гетри

Для реализации первого варианта ФС использовали листья смородины черной с различным содержанием хлорофилла, взятые с одного растения в конце августа 2020 года (сорт Белорусская сладкая). Для анализа листья были сгруппированы на 4 группы по визуальному состоянию: зеленые, светло-зеленые, желтеющие и желтые (рис.4).



Рисунок 4 - Внешний вид экспериментальных образцов листьев

После часовой тепловой и темновой адаптации проводили инструментальную оценку с помощью макетного образца разработанного прибора трех базовых показателей: интенсивность прошедшего через лист излучения красной области спектра (I_{np}), максимальную и стационарную интенсивность флуоресценции, возбуждаемой в синей области спектра. Максимальная интенсивность (F_{max}) выбиралась из показаний непрерывной записи флуоресцентного потока с частотой 0,4 отсчета в секунду, а стационарная интенсивность оценивалась на 60 секунде индукции флуоресценции после достижения максимума (F_{st-60s}). Затем осуществляли расчет всех возможных показателей из данной комбинации параметров, а именно: $Y=(F_{max} - F_{st-60s})/F_{max}$; $ПФС1=F_{max}/I_{np}$; $ПФС2=1000 \times Y/I_{np}$; $ПФС3=(F_{max} - F_{st-60s})/I_{np}$

Исходные данные и рассчитанные показатели, приведенные в таблице 2, далее прошли процедуру расчета вероятности 0-гипотезы по критерию Стьюдента для определения достоверности различий по следующим парам сравнения: Зеленые - Желтеющие; Желтеющие – Светло-зеленые; Светло-зеленые – Зеленые. Наибольшая достоверность по всем парам сравнения отмечается у следующих показателей: I_{np} и $ПФС2$. Как и следовало ожидать, все показатели, связанные только с параметрами медленной индукции флуоресценции хлорофилла не дают достоверных различий у близких по функциональному состоянию листьев, так как удельная фотосинтетическая активность одинаковая. И только когда в листьях практически нет хлорофилла, что приводит к существенному снижению интенсивностей флуоресценции F_{max} и F_{st-60s} , наблюдаются достоверные различия варианта «желтый» со всеми остальными вариантами по всем критериям, кроме Y .

Таблица 2

Параметры функциональной диагностики листьев смородины черной. Данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего

Параметр	Тип листьев смородины черной			
	Зеленые	Светло зеленые	Желтеющие	Желтые
<i>Inp</i>	63,66 \pm 0,405	83,32 \pm 5,03	122,68 \pm 4,73	403,28 \pm 14,6
<i>Fmax</i>	89,83 \pm 4,40	86,93 \pm 5,02	97,57 \pm 6,26	55,95 \pm 6,024
<i>Fst-60s</i>	16,97 \pm 1,46	18,05 \pm 1,79	17,85 \pm 0,566	11,78 \pm 1,100
<i>Y</i>	0,812 \pm 0,079	0,792 \pm 0,019	0,813 \pm 0,0084	0,783 \pm 0,024
<i>ПФС1</i>	1,41 \pm 0,069	1,056 \pm 0,114	0,796 \pm 0,042	0,140 \pm 0,017
<i>ПФС2</i>	12,76 \pm 0,095	9,56 \pm 0,511	6,706 \pm 0,275	1,957 \pm 0,12
<i>ПФС3</i>	1,14 \pm 0,059	0,836 \pm 0,093	0,65 \pm 0,0405	0,111 \pm 0,015

Второй возможный вариант функционального состояния фотосинтезирующего аппарата - это снижение фотосинтетической активности хлоропластов на фоне постоянной концентрации хлорофилла. Для испытаний были выбраны здоровые темно-зеленые листья лимона и проведены измерения на приборе до и через час после термоинактивации горячей водой при температуре 50°C (таблица 3).

Таблица 3

Параметры диагностики здоровых и инактивированных листьев лимона. Данные представлены в виде: среднее \pm ошибка среднего

Параметр	Здоровый	Инактивированный	Вероятность 0-гипотезы
<i>Inp</i>	19,22 \pm 0,835	17,35 \pm 1,042	0,175177
<i>Fmax</i>	47,56 \pm 1,361	20,53 \pm 0,397	8,3 \cdot 10 ⁻¹¹
<i>Fst-60s</i>	10,61 \pm 0,462	14,38 \pm 0,294	1,6 \cdot 10 ⁻⁶
<i>Y</i>	0,78 \pm 0,005	0,2995 \pm 0,0058	9,8 \cdot 10 ⁻²⁶
<i>ПФС1</i>	2,52 \pm 0,124	1,23 \pm 0,08	1,37 \cdot 10 ⁻⁹
<i>ПФС2</i>	41,29 \pm 1,77	17,89 \pm 1,026	2,08 \cdot 10 ⁻¹⁰
<i>ПФС3</i>	1,95 \pm 0,084	0,368 \pm 0,08	4,88 \cdot 10 ⁻⁸

В данном случае сильно варьируют параметры, связанные с медленной индукцией флуоресценции хлорофилла на фоне практически не меняющейся оптической плотности листьев в красной области спектра. Наиболее значимые изменения отмечаются у критериев Y и ПФСЗ.

Для тестирования работоспособности прибора в третьем случае ФС оценивали оптические параметры листьев лимона с различным содержанием хлорофилла, визуально классифицируемые как «Желтые», «Светло-зеленые» и «Темно-зеленые» с уровнем фотосинтетической активности 0,2-0,25; 0,4-0,53 и 0,6-0,8 соответственно. На рис.5 представлены типовые графики изменения информационного сигнала листьев всех трех вариантов опыта, отражающие режим циклического измерения в следующем порядке: измерение уровня фона (1 сек) – включение красного излучателя и измерение интенсивности прошедшего через лист света (4-5 сек) – темновая пауза (3-4 сек) – включение синего излучателя и измерение интенсивности флуоресцентного сигнала (90-120 секунд). В табл. 5 - средние значения всех измеряемых и расчетных показателей.

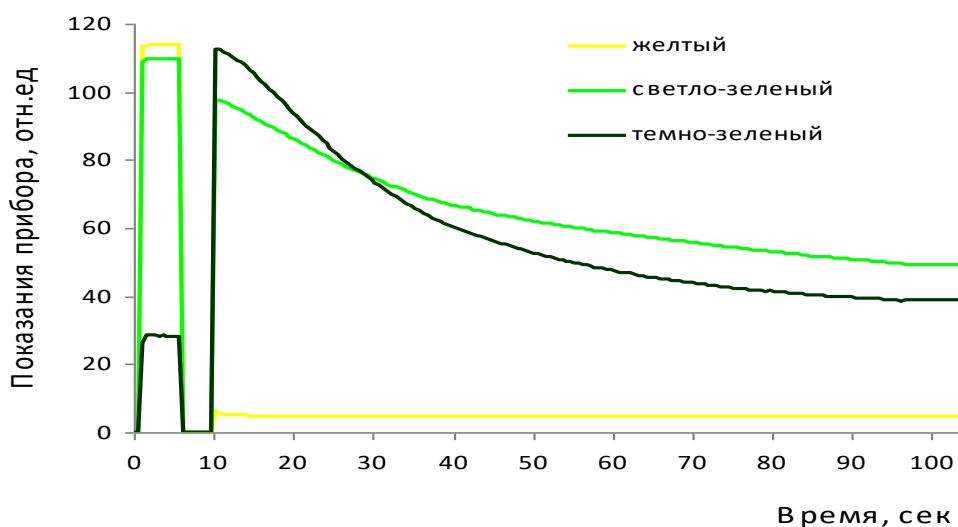


Рисунок 5 – Типовые графики изменения сигнала в зависимости от содержания хлорофилла и фотосинтетической активности листьев лимона

Сводные данные информационных показателей листьев лимона, полученные с помощью макетного образца комбинированного прибора

Варианты	I_{np}	F_{max}	F_s	Y	$100*Y/I_{np}$	F_m/I_{np}
желтый	113,77±4,8	6,1±0,83	4,88±0,66	0,2±0,07	0,176±0,03	0,054±0,008
светло-зеленый	109,88±7,1	97,44±6,6	49,35±4,83	0,49±0,11	0,449±0,09	0,887±0,22
темно-зеленый	28,47±1,6	112,62±4,7	38,18±2,22	0,66±0,17	2,32±0,34	3,95±1,04

Заключение

Проведены испытания комбинированного оптического прибора, доказавшие работоспособность используемой конструкции и предложенных диагностических критериев, а также корректность оценки функционального состояния листьев растений по критериям относительного содержания хлорофилла и фотосинтетической активности за один измерительный цикл.

Список литературы:

1. Будаговская О.Н. Конструкция макетного образца оптического прибора для оценки функционального состояния листьев растений по критериям фотосинтетической активности и относительного содержания хлорофилла// Электронный журнал Наука и образование. Т.6. №2.
2. Воробьев Н.В., Невмержицкая Ю.Ю., Хуснетдинова Л.З., Якушенкова Т.П. Практикум по физиологии растений. Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет. 2013. 80 с.
3. ГОСТ 21802-84. Паста хвойная хлорофилл-каротиновая. Технические условия. М.: Из-во стандартов. 1984.14 с.

UDC 62:535.8:634

**TEST RESULTS OF THE COMBINED
OPTICAL INSTRUMENT FOR EVALUATION
PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY AND RELATIVE
CHLOROPHYLLASE CONTENT ONE MEASURING CYCLE**

Olga N. Budagovskaya

doctor of technical Sciences, leading researcher Engineering Center

budagovsky@mail.ru

Federal research Center named after I. V. Michurin

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. The test data of an optical device for a comprehensive assessment of the functional state of plants according to the criteria of photosynthetic activity and relative chlorophyll content in one measuring cycle are presented.

Keywords: photosynthetic activity, relative chlorophyll content, leaves, combined device, tests

Статья поступила в редакцию 05.09.2023; одобрена после рецензирования 16.10.2023; принята к публикации 27.10.2023.

The article was submitted 05.09.2023; approved after reviewing 16.10.2023; accepted for publication 27.10.2023.