

КОМП'ЮТЕРНІ ЗАСОБИ, МЕРЕЖІ ТА СИСТЕМИ

*D. Artemenko, Yu. Kolesnik,
V. Fedak*

WORKING OUT OF A TECHNIQUE OF DIAGNOSTICS OF A CONDITION OF PLANTS

The list of operations and their sequence for realisation of a differential method of diagnostics and auxiliary signs of a state of control and skilled plants, conditions and modes of measurements, definitions of a state and a diagnosis establishment is considered.

Key words: plant, sign, diagnostics, technique, fluorescence.

Рассмотрен перечень операций и их последовательность для реализации дифференциального метода диагностики и вспомогательных признаков состояния контрольных и опытных растений, условий и режимов измерений, определения состояния и установления диагноза.

Ключевые слова: растение, признак, диагностика, методика, флуоресценция.

Розглянуто перелік операцій та їх послідовність для реалізації диференційного методу діагностики, вибору діагностичних і допоміжних ознак стану контрольних і дослідних рослин, умов і режимів вимірювань, визначення стану і встановлення діагнозу.

Ключові слова: рослина, ознака, діагностика, методика, флуоресценція.

© Д.М. Артеменко,
Ю.С. Колесник, В.С. Федак,
2013

УДК 381.3

Д.М. АРТЕМЕНКО, Ю.С. КОЛЕСНИК, В.С. ФЕДАК

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ДІАГНОСТИКИ СТАНУ РОСЛИНИ

Вступ. Використання явища флуоресценції було прерогативою фізіологів на протязі багатьох десятиліть. Воно дозволило поряд з іншими класичними дослідженнями глибше зрозуміти сутність процесів фотосинтезу [1]. Тільки в останні декілька років почали здійснювати спроби досліджувати впливи різних екзогенних чинників на рослини, їх флуоресценцію та фізіологію процесів. Огляд за напрямками робіт та групам дослідників у різних державах наведено в [2]. Авторами узагальнено особистий досвід та знання в розробці приладів для флуоресцентних досліджень, досвід практичних досліджень, що послужило основою для створення методики діагностики стану рослин та виробленню відповідних рекомендацій.

Робота є продовженням публікації [3] і являє собою рекомендації по розробці методик експресної діагностики стану рослин.

Мета роботи – розробка методики діагностики стану рослини, яка полягає у встановленні, виборі і докладному описі сукупності правил і послідовності операцій визначення значень діагностичної ознаки стану рослини по відношенню до нормативного діапазону значень відповідного стану. Правила і операції для конкретної методики розглядають з урахуванням вимог до вибору і використання діагностичних ознак, умов та режимів проведення діагностики [3], а також з урахуванням технічних вимог на розробку методики, які формулює замовник.

При проведенні діагностики доцільно використати положення методики експертизи [4] та методики оцінки [5], зокрема при виборі контрольних і дослідних рослин, їх репре-

зентативності, ідентичності умов вирощування і діагностики.

Терміни. Для однозначного розуміння термінів розглянемо їх тлумачення.

Діагноз – стан рослини із значенням діагностичної ознаки, яке входить в нормативний діапазон значень ознаки відповідного стану.

Норматив – діапазон значень діагностичної ознаки стану, вибраний як обов'язковий зразок для порівняння при визначенні діагнозу.

Метод діагностики – розглянуто метод диференційної діагностики, який полягає в оцінці різниці значень однакових ознак станів дослідної і контрольної рослин.

Об'єкт діагностики – різні види трав'янистих, чагарникових і деревних рослин, сорти сільгоспкультур, їх агрофітоценози та природні угруповання.

Предмет діагностики – ушкодження рослин вірусами, бактеріями, грибами, комахами тощо.

Принцип діагностики – розглянуто використання флуоресцентних ознак нативного хлорофілу інтактних листів.

Далі докладно розглянемо деякі правила та послідовність операцій діагностики.

Градації діагнозу. Більшість флуорометрів дозволяє визначати стан рослини за значеннями флуоресценції у характерних точках індукційної кривої та за значеннями флуоресцентних індексів. При цьому діагноз можна здійснювати за декількома градаціями, найменше за двома – норма та аномалія (N-A). Для цього необхідно знати діапазони нормальних значень цих ознак, прийняти їх за нормативні і з ними порівнювати поточні значення однотипних ознак стану. Так, наприклад, здійснюють діагностику карбонатного хлорозу за патентом [6]. Для діагнозу за трьома градаціями: норма, мала аномалія, велика аномалія (N-a-A) необхідно діапазон нормальних значень розділити на два діапазони, а далі як визначено раніше. При необхідності діагнозу за більшим числом градацій доцільно діяти за патентом [7]. Такий діагноз використовують при кількісній оцінці ступеню аномальності стану. Граничні значення діапазонів ознак станів стаціонарного, стресового, гранично допустимого, кризового та критичного, як зразки для порівняння, як нормативи визначають експериментально.

Як вплив чинника, так і чутливість (реакція) рослини можуть бути однонаправленими або різнонаправленими щодо нормального діапазону станів. Наприклад, однонаправлена дія дефоліантів оптимальна, коли дії нема взагалі і відлік впливу починають з нуля, або з якоїсь малої величини. Прикладом такої дії можуть бути хвороби та ураження рослин.

Прикладом різнонаправленої дії чинника може бути температура, мінеральне живлення, погодні умови та інші природні впливи, під дією яких здійснювались еволюційні адаптації рослин. Діапазон стаціонарних значень таких впливів лежить у середині діапазону можливих значень. Тому, наприклад, стресовий стан рослини може бути викликаний як малими так і великими значеннями температури, яка виходить за межі діапазону стаціонарних значень і переходить у діапазон стресових.

Шкали вимірювань. Флуорометри за своєю суттю це фотометри, бо вимірюють освітленість прийомної поверхні фотоприймача і виражають результат в одиницях напруги (mv), який у подальшому можна представити в енергетичних одиницях ($\text{Вт}\cdot\text{см}^{-2}$ або $\text{Еншт}\cdot\text{см}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$). Різні прилади мають різні характеристики сенсорного блоку, тому результати вимірювань будуть різні при однакових значеннях флуоресценції.

У більшості публікацій, зокрема, в графічних матеріалах, результати вимірювань представляють в умовних або у відносних одиницях, а до чого відносять результат, не вказують. Часто результат представляють в одиницях шкали приладу, а при представленні у відносних одиницях, відносять до максимуму шкали приладу, але сам максимум не приводять. Тому результати вимірювань складно порівнювати.

Результати вимірювань доцільно представляти у відносних одиницях щодо максимального значення вимірюваної величини тобто до F_m . При цьому зберігаються співвідношення між окремими значеннями флуоресценції індукційної кривої і можна порівнювати флуоресцентні індекси різних вимірювань і різними приладами.

Умови та режим вимірювання. Для порівняння результатів і зменшення розбіжностей вимірювань необхідно забезпечувати одноманітність вимірювань за однакових, краще нормованих умов. Наприклад, при вибраних температурах повітря і ґрунту, вологості повітря і ґрунту, на одному чи подібному ґрунті з однаковим мінеральним складом тощо. Умови мають бути нормовані у просторі та часі. У разі неможливості забезпечення цих умов у природних умовах, їх необхідно створювати штучно.

Необхідно зберігати одноманітність режиму вимірювань [3]. Час темної адаптації має бути 3 або 10 хвилин. Режим вимірювань – 1 або 3 хвилини. В польових умовах вибирають менший час операцій. Масові вимірювання краще проводити в першій половині дня від світанку до 12 годин. Точні, наукові вимірювання краще проводити між світанком і сходом сонця [3].

Вибір рослин. Сучасне промислове виробництво сільгоспродукції викликає необхідність монокультурного агроценозу, де всі рослини однакові, одного виду, сорту, однієї висоти, морфологічної будови, однакової фізіології тощо. Навіть серед таких рослин є суттєві відмінності і серед них необхідно вибрати типові, однакові, репрезентативні, представницькі. Для проведення достовірної діагностики вибирають рослини однакові генетично (краще клони), за віком і з однаковими зовнішніми морфометричними та внутрішніми структурними і функціональними ознаками. Такий вибір однакових екземплярів роблять за допоміжними ознаками, наприклад, за вмістом хлорофілу або за вмістом вологи в листях [3, 5] тощо. Крім того необхідні однакові едафічні та мікрокліматичні умови вирощування і нормовані умови вимірювання.

Контрольну і дослідну рослини вибирають разом, як репрезентативні екземпляри. Вибирають 5–7 контрольних і 5–7 дослідних на кожну градацію чинника. Відмінності між контрольною і дослідною рослинами мають бути мінімальними. Чим більше ознак контрольної і дослідної рослини будуть співпадати, тим ско-

ріше і достовірніше можна діагностувати вплив чинника малої інтенсивності. Ідентичність контрольної і дослідної рослин перевіряють шляхом вимірювання діагностичної ознаки без дії чинника на протязі доби до початку дії чинника.

Допоміжні ознаки. Як допоміжні ознаки [3] при виборі контрольної і дослідної рослин доцільно використовувати вміст хлорофілу в листях, бо від нього залежить як фотосинтез, так і флуоресценція. Вміст хлорофілу визначають як індекси флуоресценції, поглинання або відбиття [8]. Допоміжні ознаки зменшують неоднозначність вимірювань. Допоміжними ознаками можуть бути вміст вологи в листях, ознаки транспірації тощо.

Діагностичні ознаки. Один із способів вибору наступний. Стан рослини міняють від нормального через стресовий, допустимий, кризовий, критичний до летального шляхом зміни впливу чинника [7]. Кожен з цих станів має свої значення різних, у тому числі флуоресцентних ознак. Для кожного із станів міряють значення ознак. Ознака, значення якої найбільше корелює із зміною чинника, і може слугувати діагностичною ознакою. Такими ознаками можуть слугувати флуоресцентні індекси індукційної кривої [3].

Інколи як діагностичні ознаки використовують коефіцієнти апроксимуючого полінома індукційної кривої або її фрагменту.

Нормативи. Нормативи формують за визначеними вимогами до нормативів, розглянутими в [3]. При виборі діагностичної ознаки змінюють стан рослини і фіксують значення діагностичної ознаки. Діапазон цих значень між переходами від одного стану до іншого, названий в [7] характерними значеннями і характерними діапазонами, приймають за нормативні значення станів.

Інший підхід до формування нормативів полягає у побудові градуіровочної залежності значень діагностичної ознаки від величини чинника. На цій кривій виділяють діапазони значень ознаки нормального та інших станів [8].

Відомі варіанти флуоресцентної діагностики:

- оцінюють кореляцію флуоресцентних ознак і з значеннями чинника [9];
- оцінюють відмінності індукційних кривих за значеннями флуоресценцій в кардинальних точках [3];
- індукційну криву або її фрагменти апроксимують поліномами і порівнюють контроль – дослід за коефіцієнтами поліномів [3]. Порівняння поліномів еквівалентно порівнянню кривих.

Діагностичні флуоресцентні ознаки стану рослин.

1. Характерні значення флуоресценції індукційної кривої та їх комбінації у вигляді індексів [3].
2. Час досягнення певних значень флуоресценції індукційної кривої та проміжки між ними.
3. Лінійність вибраного фрагменту [10].
4. Вимірювання флуоресценції при різних режимах опромінення (AM, LM, SP, модуляція) [11, 12].
5. Одночасне сумісне використання декількох флуоресцентних ознак [13, 14].
6. Використання ознак термоіндукції [12].

7. Використання коефіцієнтів апроксимуючого поліному індукційної кривої або її фрагменту.

8. Використання показника $FR (F_{740}/F_{680})$ як експрес-метод вмісту хлорофілу.

Визначення стану рослини. Стан рослини визначають як миттєві значення вибраного переліку ознак. Тому визначення стану рослини полягає у вимірюванні значення діагностичних ознак на репрезентативній рослині за певних фіксованих умов, каліброваним приладом і представлення результатів у формі, зручній для подальшого аналізу.

Так індукційна крива і всі флуоресцентні ознаки, згадані вище, теж є ознаками стану. Але серед них необхідно вибрати діагностичну, яку в подальшому і будуть використовувати. Її вибирають засобом, згаданим вище, і за вимогами, наведеними в [2]. Спосіб вибору репрезентативних рослин і умов вимірювання розглянуто вище.

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 кривої індукції флуоресценції хлорофілу. Такі зміни кривої індукції флуоресценції хлорофілу дослідної рослини, на яку діє збуджуючий чинник у порівнянні з індукцією флуоресценції хлорофілу контрольної рослини на яку чинник не діє, свідчать про вплив чинника. Ідентифікація дії чинника потребує вибору специфічного показника кривої індукції флуоресценції хлорофілу якому відповідає дія саме цього чинника.

Досі такими показниками є різні індекси флуоресценції хлорофілу, які використовують характерні значення індукційної кривої, як F_0 , F_m , F_{pl} , F_{st} тощо.

Диференційний спосіб діагностики. За діагностичну ознаку стану рослини у розглянутому диференціальному способі прийнято максимальне значення різниці відповідних за часом значень флуоресценцій індукційних кривих дослідної і контрольної рослин. Наявність такої різниці свідчить про вплив чинника і такий вплив буде максимальним при максимальній різниці. Далі на ряд дослідних рослин діють зовнішнім чинником різної величини. Шляхом опромінення листа рослини після темної фази світлом з довжиною хвилі у діапазоні довжин хвиль 400 – 650 нм, прийому, вимірювання та реєстрації сигналів флуоресценції у діапазоні хвиль 670 – 770 нм, будують криву індукції флуоресценції контрольної і дослідних рослин. Порівнюючи відповідні поточні значення флуоресценції дослідної і контрольної рослин знаходять максимальні значення їх різниць і будують градуировочну залежність максимальної різниці від зовнішнього чинника.

Градуировочна залежність дозволяє вирішувати пряму і обернену задачі діагностики. Так за вимірюваним миттєвим значенням діагностичного показника стану можна визначити чинник, що викликав відхилення показника стану від нормального та його величину. Або за величиною чинника можна спрогнозувати значення показника стану.

На градуировочній залежності задають діапазон значень діагностичного показника і відповідних значень зовнішнього чинника для оптимального стану рос-

лин. На цьому закінчується стадія підготовки нормативу для діагностики.

Тепер стадія власне діагностики полягає у визначенні стану рослини і порівнянні його з нормативом. Для цього будують індукційні криві дослідної і контрольної рослин зазначеним вище способом, порівнюють відповідні значення флуоресценцій, виділяють значення максимальної різниці і порівнюють його із значеннями діапазону значень нормального стану на градуіровочній кривій. Якщо визначена різниця лежить у межах заданого діапазону, то стан рослини вважають нормальним якщо зовні діапазону, то стан рослини відрізняється від нормального, тобто від стану контрольної рослини. За величиною відхилення від оптимальних значень показників стану судять про ступінь відхилення від норми. При цьому визначають величину чинника, що викликав таке відхилення від норми.

Приклад реалізації диференційної методики. Досліди проводились на листях дурману, який вирощували в горщиках за гідропонною системою у фіто камері при однакових умовах для контрольної і дослідних рослин. Діючим чинником був розчин добрива у концентраціях $K_1 : K_2 : K_3 : K_4 = 0:10:20:30$. Позначимо їх як (a_1, a_2, \dots, a_n) . Значення n у нашому випадку дорівнює 4. Поточні значення флуоресценції нативного хлорофілу інтактного листа визначали флуорометром "Флоратест" (патент UA 12382 з сенсором по патенту UA 13481). Позначимо їх як $F_{a1}, F_{a2}, \dots, F_{an}$. Але можуть бути використані будь-які й інші флуорометри.

За цикл вимірювань здійснюють темнову адаптацію, опромінення листа, відлічення та вимірювання сигналів флуоресценції з подальшим накопиченням і зберіганням у пам'яті приладу. З поточних значень флуоресценції будують ряд індукційних кривих (рис.1), де крива 1 – для контрольної рослини, а криві 2, 3, 4 – дослідних рослин з відповідними значеннями концентрацій добрива.

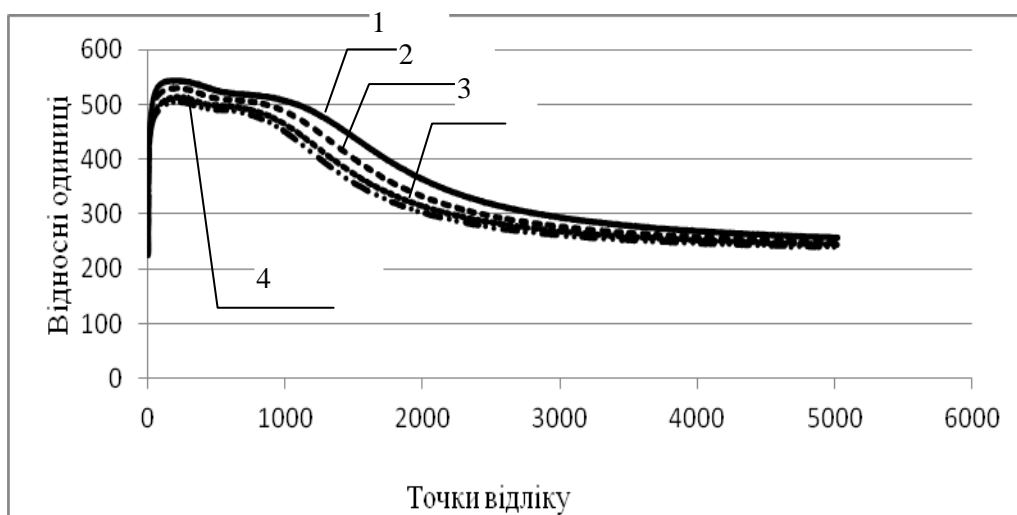


РИС. 1

Далі порівнюють відповідні значення флуоресценції контрольної 1 і дослідних рослин 2, 3, 4, тобто визначають їх різницю $(F_{a1} - F_{a2}) = \Delta_1$, $(F_{a1} - F_{a3}) = \Delta_2$, ..., $(F_{a1} - F_{a4}) = \Delta_3$. Будують криві різниць відповідних флуоресценцій у часі (рис. 2), де 1, 2, 3 – відповідні різниці, які викликані відповідними значеннями чинника $(a_2, \dots a_n)$.

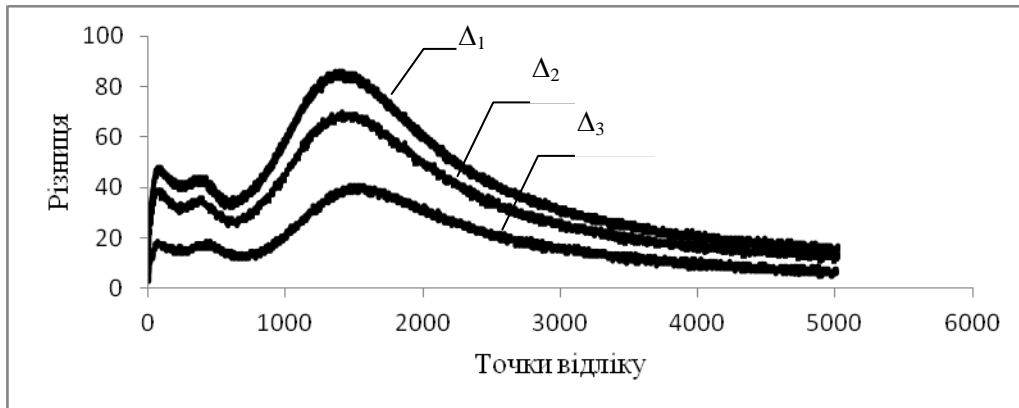


РИС. 2

З максимальних значень таких різниць будують градуіровочну залежність від значення чинника (рис. 3).

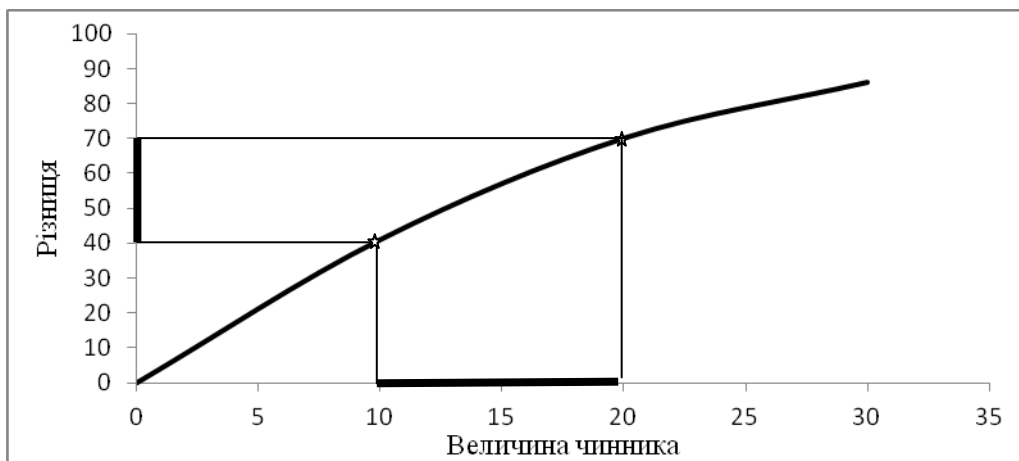


РИС. 3

Якщо визначена різниця лежить у межах заданого діапазону, то стан рослини вважають нормальним. Якщо різниця лежить за межами діапазону, то стан

рослини відрізняється від нормального. При цьому ще визначають величину чинника, що викликав таке відхилення від норми.

На цій залежності задають діапазон значень різниць відповідних нормальному стану рослини, наприклад, 40 – 70. Йому відповідає величина чинника 10 – 20. Це слугує нормативом при діагностиці. На цьому закінчується I етап – підготовка нормативів для діагностики.

Нормативи готують для певних видів і сортів сільгоспкультур та для певних зовнішніх чинників, наприклад, метеорологічних умов, показників ґрунту, засобів захисту рослин, агротехнічних заходів тощо.

Далі, власне діагностика включає: визначення стану рослини, тобто знаходять максимальну різницю відповідних значень флуоресценції контрольної і дослідної рослин, визначають її відношення до нормативного діапазону значень (40 – 70) і роблять висновок про стан рослини, а також про значення чинника, який викликав цей стан.

Більшість літературних джерел, обіцяючи методики інструментальної діагностики стану рослини, фактично надають способи визначення стану рослини, помилково вважаючи його діагнозом.

Запропонований спосіб діагностики стану рослин, як видно з його опису, може бути реалізований у виробничих умовах з використанням будь яких хлорофіл-флуорометрів. Спосіб дозволяє значно розширити номенклатуру флуоресцентних ознак стану рослин і підвищити достовірність діагнозу. Спосіб має зацікавити дослідників впливу різних чинників на стан рослини, зокрема, добрив, засобів захисту рослин, біологічно активних речовин, агротехнічних заходів тощо.

Висновки. 1. Різноманіття задач діагностики не дозволяє створити єдину універсальну методику діагностики. Під кожен задачу необхідно створювати свою інструментальну методику. Розглянута методика орієнтована на експрес діагностику впливу екзогенних чинників на стан рослини.

2. Спільними рисами методик діагностики стану рослин, зокрема, флуоресцентних, є: вибір, використання, вимірювання і інтерпретація ознак; вибір репрезентативних рослин; нормовані умови та режими вимірювань.

3. Запропонована диференційна методика діагностики може бути використана для задач з різною об'єктною направленістю і предметною специфікою для широкої номенклатури діагностичних показників та може бути рекомендованим для використання з приладами з обмеженими діагностичними характеристиками.

1. *Claus Buschmann*. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves // *Photosynthesis Research*. – 2007. – Vol. 92, N 2. – P. 261 – 271.
2. *Larry Orr Govindjee*. *Photosynthesis online* // *Photosynth Res*. – 2010. – 105. – P. 167 – 200.
3. *Артеменко Д.М., Федак В.С.* Стан рослин та його діагностика // *Комп'ютерні засоби, мережі та системи*. – 2012. – № 11. – С. 99 – 108.
4. *Методика кваліфікаційної експертизи сортів рослин з визначень показників придатності до поширення в Україні*. – К.: Алефа, 2011. – Вип. 1-5.

5. *Ляшенко Г.В.* Методика оцінки агрокліматичних ресурсів та картографування з урахуванням мікроклімату. – ІВіВ ім. Таїрова, Одеса. – 2009.
6. *Патент* України на винахід UA № 82894. «Спосіб ідентифікації карбонатного хлорозу рослин». Войтович І.Д., Китаєв О.І., Кондратенко П.В., Клочан П.С., Романов В.О., Федак В.С., Козак Н.І. Бюл. № 10, 2008.
7. *Патент* України на корисну модель № 72708. «Спосіб діагностики стану рослин». Артеменко Д.М., Романов В.О., Федак В.С. Бюл. № 15, 2012.
8. *Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Сойер В.Г., Краснов В.П.* Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: Теоретические основы применения метода // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 4. – С. 112 – 120.
9. *Заявка* на винахід України № 20130514, 29.04.3013. Спосіб діагностики стану рослини. Артеменко Д.М., Колеснік Ю.С., Романов В.О., Федак В.С.
10. *Патент* України на винахід № 91452. Спосіб виявлення вірусних уражень рослин. Артеменко Д.М., Васюта С.Д., Войтович І.Д., Китаєв В.І., Клочан П.С., Колесник Ю.С., Міщенко С.Т., Романов В.О., Скряга В.А., Тарануха В.Н., Федак В.С.
11. *Корнеев Д.Ю.* Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. – Киев: Альтпрес, 2002. – 188 с.
12. *Артеменко Д.М., Китаєв О.І., Федак В.С.* Портативний РАМ хлорофіл-флуорометр з вимірюванням термоіндукції // *Комп'ютерні засоби, мережі та системи.* – 2010. – № 9. – С. 92 – 98.
13. *Патент* України на винахід № 83752. Спосіб визначення сумісності компонентів сортопідщепних комбінувань. Китаєв О.І., Долід А.В., Матвієнко М.В., Клочан П.С., Кишак Е.А., Колесник Ю.С., Романов В.О., Федак В.С. Бюл. № 15, 2008.
14. *Патент* України на винахід № 85524. Спосіб визначення водного дефіциту листя рослин. Китаєв О.І., Андрусик Ю.І., Клочан П.С., Ковалевський І.В., Колесник Ю.С., Лушпиган О.П., Романов В.О., Скряга В.А., Бедненко Т.В., Федак В.С. Бюл. № 2, 2009.

Одержано 12.10.2013