



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: 292470

(22) Data zgłoszenia: 19.11.1991

(51) IntCl⁶:
G01N 33/00
G01N 21/64

(54)

Sposób określania odporności roślin na suszę

GZYTELNOŚĆ
GŁÓWNA

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
30.11.1992 BUP 24/92

(73) Uprawniony z patentu:
Akademia Rolnicza, Szczecin, PL

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.06.1995 WUP 06/95

(72) Twórca wynalazku:
Antoni Murkowski, Szczecin, PL

(57)

Sposób określania odporności roślin na suszę polegający na częściowym odwodnieniu jednej części próbek zielonych części badanych roślin poprzez suszenie w podgrzanym powietrzu lub odwodnienie na powierzchni roztworów o wysokim ciśnieniu osmotycznym w temperaturze nie zakłócającej przebiegu procesu fotosyntezy i przechowaniu w tym czasie drugiej części próbek z tych samych części roślin spełniających rolę próbek kontrolnych w tej samej temperaturze i w 100% wilgotności względnej, **znamienny tym**, że po uzyskaniu 50-60% odwodnienia próbki odwodnione i kontrolne poddaje się wzbudzeniu promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym o natężeniu wyższym niż $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ korzystnie $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, po czym rejestruje się opóźnioną fluorescencję w pasmie od 680 nm do 730 nm w zakresie od 1 sekundy do 50 sekund, licząc od momentu wyłączenia promieniowania wzbudzającego, a wyniki zestawia się w postaci współczynników określających odporność rośliny na suszę, będących stosunkiem natężenia opóźnionej fluorescencji próbek odwodnionych do natężenia opóźnionej fluorescencji próbek kontrolnych.

Sposób określania odporności roślin na suszę

Zastrzeżenie patentowe

Sposób określania odporności roślin na suszę polegający na częściowym odwodnieniu jednej części próbek zielonych części badanych roślin poprzez suszenie w podgrzanym powietrzu lub odwodnienie na powierzchni roztworów o wysokim ciśnieniu osmotycznym w temperaturze nie zakłócającej przebiegu procesu fotosyntezy i przechowaniu w tym czasie drugiej części próbek z tych samych części roślin spełniających rolę próbek kontrolnych w tej samej temperaturze i w 100% wilgotności względnej, **znamienny tym**, że po uzyskaniu 50-60% odwodnienia próbki odwodnione i kontrolne poddaje się wzbudzeniu promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym o natężeniu wyższym niż $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ korzystnie $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, po czym rejestruje się opóźnioną fluorescencję w pasmie od 680 nm do 730 nm w zakresie od 1 sekundy do 50 sekund, licząc od momentu wyłączenia promieniowania wzbudzającego, a wyniki zestawia się w postaci współczynników określających odporność rośliny na suszę, będących stosunkiem natężenia opóźnionej fluorescencji próbek odwodnionych do natężenia opóźnionej fluorescencji próbek kontrolnych.

* * *

Przedmiotem wynalazku jest sposób określania odporności roślin na suszę, szczególnie roślin we wczesnych stadiach ich rozwoju, przydatny zwłaszcza do selekcyjnej oceny poszczególnych genotypów lub całych rodów i odmian roślin poddanych stresowi suszy.

Znane są laboratoryjne sposoby określania odporności roślin na suszę polegające na pomiarze wpływu elektrolitów z komórek liści przy użyciu metod konduktometrycznych. Metody te można wykorzystywać w ocenie roślin wziętych z doświadczeń polowych, a także rosnących w warunkach kontrolowanych, jak np. w halach wegetacyjnych, szklarniach, komorach klimatycznych itp.

Stosowana jest metoda suszenia ściętych liści w stałej nieco podwyższonej temperaturze przez określony okres czasu, a także metoda suszenia do utraty przez liście badanych roślin około 50-60% zawartej wody, co powoduje nieodwracalne uszkodzenia cytoplazmy i błon biologicznych. Suszenie odbywa się w termostatach w temperaturze 30°C przy względnej wilgotności około 60%. Serię 5-8 prób liści o masie początkowej około 1 g waży się co 45 minut, aż nastąpi ubytek połowy zawartej wody, następnie naważki liści umieszcza się w krystalizatorach i zalewa 50 ml destylowanej wody, a następnie odstawia do szafy i pozostawia na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Tak samo postępuje się z serią kontrolną składającą się również z 5-8 prób liści nie poddanych suszeniu w termostacie. Po upływie 2 godzin mierzy się przy użyciu konduktometru przewodnictwo roztworów, w których znajdowały się próbki badane i kontrolne. Następnie obie serie, badaną oraz kontrolną, umieszcza się na 10 minut we wrzącej kąpieli wodnej. W tak podwyższonej temperaturze następuje całkowity wyciek elektrolitów z tkanek roślinnych. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej powtarza się pomiar przewodności roztworów, w których znajdowały się próbki badane i próbki kontrolne. Otrzymane wartości przyjmuje się jako 100% wycieku i względem nich oblicza się względne wycieki elektrolitów komórkowych, które nastąpiły w wyniku stresu suszy oraz względne wycieki z próbek kontrolnych. Miarą uszkodzenia tkanek roślinnych w wyniku wywołanej suszy jest stosunek względnego wycieku z próbek badanych do względnego wycieku z próbek kontrolnych.

Znane są także sposoby badania odporności na suszę, w których powietrzne suszenie w termostatach zastępuje się zanurzeniem liści na okres 4-18 godzin w roztworach posiadających wysokie ciśnienie osmotyczne. Stosuje się w tym celu roztwory sacharozy, manitolu i inne o takich stężeniach, by ich ciśnienie osmotyczne mieściło się w granicach 3-5 MPa. Wyciek elektrolitów z tkanek roślinnych określa się również przez wzrost przewodnictwa roztworu.

Metody te są od dość dawna stosowane, jednak cechuje je wysoka czaso- i pracochłonność, a uzyskane wyniki odznaczają się dużym rozrzutem, co uniemożliwia dokładniejszą klasyfikację odporności na suszę poszczególnych odmian i rodów, a zwłaszcza pojedynczych genotypów.

Celem wynalazku jest opracowanie takiego sposobu określania odporności roślin na suszę, w którym badaniu podlegać będą reakcje pierwotne fotosyntezy silnie ulegające zakłóceniom podczas działania stresu suszy.

Pobierając próbki tkanek roślin do badań jedną ich część poddaje się odwodnieniu poprzez działanie suszy powietrznej lub odwodnieniu w roztworach o dużym ciśnieniu osmotycznym, w temperaturze podwyższonej, lecz nie zakłócającej przebiegu fotosyntezy. Drugą część pobranych próbek tej samej rośliny traktuje się jako próbki kontrolne i przechowuje w tej samej temperaturze, lecz w warunkach 100% wilgotności względnej. Istota sposobu określania odporności roślin na suszę według wynalazku polega na tym, że po uzyskaniu 50-60% odwodnienia badanych roślin próbki odwodnione i próbki kontrolne poddaje się wzbudzeniu promieniowaniem foto- syntetycznie czynnym o natężeniu wyższym niż $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ korzystnie $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, po czym rejestruje się opóźnioną fluorescencję w paśmie od 680 nm do 730 nm, w zakresie od 1 sekundy do 50 sekund, licząc od momentu wyłączenia promieniowania wzbudzającego. Wyniki rejestracji zestawia się w postaci współczynników określających odporność roślin na suszę, będących stosunkiem natężenia opóźnionej fluorescencji próbek odwodnionych do natężenia opóźnionej fluorescencji próbek kontrolnych.

Opóźniona fluorescencja zielonych tkanek informuje o stanie fizjologicznym rośliny, a z analizy zmian natężenia opóźnionej fluorescencji można wnioskować o reakcjach stresowych i adaptacyjnych charakterystycznych dla danego gatunku lub odmian.

Przedstawione rozwiązanie ma tę istotną zaletę, że pobierając niewielką ilość badanych tkanek roślinnych, w wielokrotnie krótszym czasie uzyskuje się wyniki, które z dużą wiarygodnością określają odporność rośliny na stresowy czynnik suszy.

Sposób według wynalazku zostanie bliżej objaśniony na dwóch przykładach wykonania.

P r z y k ł a d I. Z liści 20 dniowych siewek pszenicy odmiany Odessa 51, o dużej odporności na suszę, odcina się środkowe fragmenty drugich liści o długości 4 cm. Połowę fragmentów traktowanych jako kontrolne, umieszcza się w zamkniętych szklanych szalkach na wilgotnej bibule, a drugą połowę umieszcza się w otwartych i suchych szalkach. W obu seriach, kontrolnej i suszonej znajduje się po 6 prób. Z kolei obie serie umieszcza się na 4 godziny w termostacie w temperaturze $+30^{\circ}\text{C}$. Po tym czasie następuje ubytek od 50% do 60% wody w suszonych tkankach roślinnych na szalkach otwartych. Próbki odwodnione i kontrolne poddaje się wzbudzeniu białym światłem o natężeniu $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promieniowania fotosyntetycznie czynnego przez 12 sekund w kamerze pomiarowej, po czym rejestruje się natężenie opóźnionej fluorescencji w paśmie 680-730 nm po 16 sekundach od momentu wyłączenia światła wzbudzającego. Następnie oblicza się współczynniki, będące stosunkiem natężenia opóźnionej fluorescencji próbek odwodnionych do natężenia opóźnionej fluorescencji próbek kontrolnych, przyjmując to ostatnie jako 100%. Takie same pomiary oraz obliczenia wykonuje się we fragmentach liści siewek pszenicy odmiany Bezostna 1, która wykazuje małą odporność na suszę. Wyniki obu serii pomiarów po obliczeniu błędów statystycznych zestawiono w tabeli:

Odmiany wzorcowe	%
Odessa 51 (odporna)	$84,6 \pm 4,8$
Bezostna 1 (nieodporna)	$16,4 \pm 3,6$

Uzyskane wyniki pozwalają podzielić badane w ten sam sposób inne odmiany o nieznanej odporności na trzy grupy:

1. bardziej odporne na suszę niż odmiana odporna
2. średnioodporne, o odporności pośredniej,
3. nieodporne, o odporności mniejszej od odmiany słaboodpornej na suszę.

Przykład II. Z liści 10 dniowych siewek jęczmienia odmiany Gryf o dużej odporności na suszę odcina się środkowe fragmenty pierwszego liścia o długości 3 cm. Połowę fragmentów traktowanych jako kontrolne umieszcza się na powierzchni wody destylowanej, a drugą połowę na powierzchni 1,5 molowego roztworu sacharozy, którego ciśnienie osmotyczne wynosi 4,2 MPa czyli około 43 atm. Obie serie próbek, po 6 sztuk każda, umieszcza się w termostacie w temperaturze 30°C na 3 godziny. Po tym czasie próbki odwodnione i kontrolne zostają wzbudzane białym światłem jak w przykładzie pierwszym, po czym tak samo rejestruje się natężenie opóźnionej fluorescencji próbek odwodnionych oraz próbek kontrolnych i oblicza się stosunki natężenia jak wyżej. Takie same pomiary oraz obliczenia wykonuje się na fragmentach 10 dniowych siewek jęczmienia odmiany Aramir, wykazującej małą odporność na suszę. Wyniki obu serii pomiarów zestawiono w tabeli:

Odmiany wzorcowe	%
Gryf (odporna)	78,8 ± 5,2
Aramir (nieodporna)	21,4 ± 4,3

Uzyskane wyniki pozwalają podzielić badane w ten sam sposób, inne odmiany o nieznannej odporności na trzy grupy odpornościowe, analogicznie jak w przykładzie pierwszym.