

Zaštita bilja
Vol. 62 (2), № 276, 147-152, 2011, Beograd

UDK 576.385
57.044:544.526.1
Naučni rad

PRELIMINARNA ZAPAŽANJA O PRIMENI METODE FLUORESCENCIJE HLOROFILA U FITOPATOLOGIJI KOD NAS

NIKOLIĆ BOGDAN*, IVANOVIĆ ŽARKO, ĐUROVIĆ SANJA,
STAROVIĆ MIRA, ZORAN MILIĆEVIĆ

Institut za zastitu bilja i zivotne sredine, Beograd
* e-mail: bogdannik@mail2world.com

Među brojnim biohemijskim, mikrobiološkim, a odskora i molekularnim metodama, koje se koriste u fitopatološkoj praksi u nas, nismo zapazili primenu biofizičkih metoda, koje se široko primenjuju u ekofiziologiji biljaka, fundamentalnoj disciplini. U svetskoj literaturi postoje primeri za aplikaciju biofizičkih metoda, a posebno fluorescencije hlorofila, u detekciji patogenih simptoma gajenih biljaka *in situ*. Zato smo testirali metodu tzv. nemodulisane fluorescencije hlorofila za detekciju fizioloških promena (uzrokovanih fitopatološkim razlozima) na dve sorte vinove loze (*Vitis vinifera* L), Game Bojadiser i Frankovka, zaražene biljnim virusima. Prisustvo tih virusa detektovano je uobičajenim mikrobiološkim metodama.

Ključne reči: nemodulisana fluorescencija hlorofila, vinova loza, Game Bojadiser, Frankovka, biljni virusi.

UVOD

Paraziti pri interakciji sa biljkom inhibiraju i fotosintezu (van Kooten i sar., 1990; Bowden i sar., 1990; Koh i sar., 1994; Peterson i Aylor, 1995; Gurney i sar., 1995; Allen i sar., 1999). Razmatrani su mehanizmi koji dovode do ove inhibicije fotosinteze. Razlikujemo fizičke fa-ktore inhibicije i inhibiciju ćelijskih i metaboličkih procesa (Scholes, 1992). Tako, fitopatogena gljiva *Cercospora* remeti fotosintezu produkcijom fungotoksina cercosporina (Foyer i sar., 1994), dok parazitska osa *Vespa lewisii* to radi pomoću mastoparana-elicitora hiper-

senzitivne reakcije (Allen i sar., 1999), a TMV virus vrši inhibiciju fotosinteze inkorporacijom DNK (sintetisana reverznom transkriptazom iz virusne RNK) u hloroplastni genom domaćina (van Kooten i sar., 1990). Inhibicija fotosinteze takođe je uzrokovana i smanjenjem količine i/ili aktivnosti Rubisco-a (ključni enzim u fotosintetskoj fiksaciji CO₂), degradacijom drugih fotosintetskih struktura, povratnom (*feedback*) inhibicijom, usled nagomilavanja ugljenih hidrata i fungalnog sekvestracijom neorganskog fosfata iz citosola, što remeti odvijanje Kalvinovog ciklusa (fotosintetska fiksacija CO₂; Scholes, 1992). Nije jasno koji je od ovih procesa primarni uzrok inhibicije fotosinteze, ali u praktičnom pogledu značajno je da se većina ovih simptoma javlja pre vidljivog dejstva parazita na domaćina (van Kooten i sar., 1990; Bowden i sar., 1990; Koh i sar., 1994; Peterson i Aylor, 1995; Allen i sar., 1999). Znači, metode detekcije fotosinteze (npr. fluorescencija hlorofila) mogu se koristiti i u fitopatologiji.

MATERIJAL I METODE

Kao ogledne biljke korišćene su dve sorte vinove loze (*Vitis vinifera* L), Game Bojadiser i Frankovka, zaražene biljnim virusima (GFKV, GLRa-1, GLRa-3). Merenje parametara indukcije fluorescencije hlorofila (definisani saglasno: Strasser et al., 1995) obavljeno je na mladim listovima sa vrha čokota (*vrsni* (**v**) *listovi*, nemaju vidljivih simptoma), kao i na starijim listovima (*donji* (**s**) *listovi*, imaju vidljivih simptoma) iz srednjeg dela čokota, pomoću *Handy PEA* fluorometra (*Hansatech*, UK), posle jednog časa zatamnjenja listova (lisnom viljuškom). Merena je i temperatura vazduha (26-28 °C ±15%) i intenzitet sunčeve svetlosti (PAR: oko 1800 tj. 1200 (μmol m⁻²s⁻¹ na **v** listovima sorti Game Bojadiser tj. Frankovka, kao i oko 550 μmol m⁻² s⁻¹ na **s** listovima obe sorte) na površini merenih listova. Merenje parametara fluorescencije Chla izvršeno 23.VIII 2006 g. Rezultati su dati kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. Kao interni standard za kontrolne biljke poslužile su nam vrednosti Fv/Fm parametra fluorescencije Chla zdravih biljaka vinove loze u stakleniku Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu (0,797±10%, tj. 0,775±2% kod **v** tj. **s** listova), kao i nalaz Bjorkman-a i Demmig-ove (1987), da vrednost Fv/Fm kod većine zdravih C₃ biljaka iznosi 0,832±0,004. Uzimanje uzoraka odgovarajućih listova za fitopatološku analizu izvršeno je oko 30 dana kasnije, sa istih čokota i ekvivalentnih (**v**, **s**) listova pomenutih sorti vinove loze. Prisustvo biljnih virusa u listovima vinove loze određivano je na osnovu vrednosti apsorpcije (A₄₅₀) u DAS i TAS ELISA imuno-hemijском testu za navedene viruse.

REZULTATI I DISKUSIJA

Primetno je da Fv/Fm parametar kvantne efikasnosti PS II kod sorte Frankovka ima više vrednosti u odnosu na sortu Game Bojadiser, što važi i kod ostalih praćenih parametara fluorescencije hlorofila (Tabela 1). Ta razlika je posebno značajna kada poredimo listove iz srednjeg dela čokota (s), koji pokazuju vidljive simptome viroze. To ukazuje na veću osetljivost fotosinteze lista sorte Game Bojadiser prema biljnim virusima u odnosu na sortu Frankovka. Zanimljivo je i da vrednost parametra *area* (koji se odnosi na redoks stanje pula plastohinona, tj. status fotosintetskog transporta elektrona posle PS II) odgovarajuća vrednostima Fv/Fm parametra kvantne efikasnosti PS II (Tabela 1). Naime ti parametri opisuju različite procese u fotosintezi (Krause i Weis, 1991). Mišljenja smo da se ovi parametri mogu koristiti u alternaciji i/ ili zajedno i da su pogodni za primenu i u fitopatologiji. Prisustvo biljnih virusa (GFkV, GLRa-1, GLRa-3) u ovim biljkama potvrđeno je klasičnim fitopatološkim metodama (Tabela 2). Naznačeni virusi su prisutniji u s (donjim), nego u v (vršnim) listovima, što se slaže sa prethodnim zapažanjem o većoj fotosintetskoj aktivnosti mladih (vršnih) listova. Mišljenja smo da se parametri indukcije fluorescencije Chla mogu koristiti u prethodnim fitopatološkim ispitivanjima. Prednost ove metode zasniva se na objektivnom i nedestruktivnom merenju pokazatelja fiziološkog statusa biljaka.

Tabela 1 - Parametri fluorescencije hlorofila. Merenje izvršeno 23.08. 2006 g. na vršnim (v) i donjim (s) listovima Game Bojadiser i Frankovka sorata vinove loze.

Table 1 – Parameters of fluorescence of chlorophyll. Measurement conducted on 23.08. 2006. on upper (v) and lower (s) leaves of Game Bojadiser and Frankovka cultivars of grapevine.

Parametri fluorescencije hlorofila/ parameters of fluorescence of chlorophyll	Sorta loze Game Bojadiser/ Vine Cultivar Game Bojadiser		Sorta loze Frankovka/ Vine Cultivar Frankovka	
	v	s	v	s
F ₀	414.33 ±73.70	287.67 ±8.33	402.33 ±22.19	318.00 ±60.11
Fm	1484.00 ±201.13	943.67 ±193.87	1849.67 ±126.98	1403.33 ±466.61
Fv/Fm	0.715 ±0.076	0.686 ±0.071	0.782 ±0.014	0.764 ±0.044
Pindex	1.749 ±0.814	0.695 ±0.373	3.013 ±0.772	3.532 ±2.715
Tfm (ms)	323.33 ±68.07	460.00 ±163.70	363.33 ±118.46	500.00 ±200.00
Area (bms)	32866.67 ±10477.28	19733.33 ±4801.39	45000.00 ±5257.38	36666.67 ±12512.93

Tabela 2 – Prosečne vrednosti apsorpcije (A_{450}) u DAS i TAS ELISA testu na GFkV, GLRa-1, i GLRa-3 viruse u listovima Game Bojadiser (GB) i Frankovka (F) sorti vinove loze. Prisustvo virusa u uzorku označeno sa »+«, a odsustvo sa »-«. Broj reda i čokota u vinogradu dati u zagradi, a položaj listova sa v (vrsni) i s (donji). Date su vrednosti pozitivne (»+«) i negativne (»-«) kontrole (Ctrl) izraženo u vrednostima apsorpcije (A_{450}).

Table 2 – Averaged values of absorption (A_{450}) in DAS and TAS ELISA tests on GFkV, GLRa-1 and GLRa-3 viruses in leaves of Game Bojadiser (GB) and Frankovka (F) grapevine cultivars. Position of grapevine plants (number of row and plant in row) and leaves (v, s) are given in parenthesis. Presence or absence of viruses in leaf sample designed by »+« and by »-«. Values of positive (»+«) and negative (»-«) control (Ctrl) provided by values of absorption (A_{450}).

Sorta loze (red/čokot), pozicija lista; vine cultivar (number of row and plant in row), position of leaf	virus tipa; type of viruses GFkV	virus tipa; type of viruses GFLV	virus tipa; type of viruses ArMV	virus tipa; type of viruses GLR a-1	virus tipa; type of viruses GLR a-2	virus tipa; type of viruses a-3	virus tipa; type of viruses GLR a-5	virus tipa; type of viruses GLR a-7	virus tipa; type of viruses GVA
F (5;3) s	(0.210) «-«	-	-	(1.404) «+«	-	(1.331) «-«	-	-	-
F (5;3) v	(0.251) «-«	-	-	(1.449) «+«	-	(1.356) «-«	-	-	-
F (5;8) s	1.072 «+«	-	-	1.459 «+«	-	1.353 «-«	-	-	-
F (5;8) v	(1.004) «+«	-	-	(1.358) «+«	-	(1.331) «-«	-	-	-
F (5;16) s	(0.322) «-«	-	-	(1.408) «+«	-	(1.315) «-«	-	-	-
F (5;16) v	(0.266) «-«	-	-	(1.427) «+«	-	(1.354) «-«	-	-	-
GB (3; 9) s	(0.726) «+«	-	-	(1.483) «+«	-	(1.286) «-«	-	-	-
GB (3; 9) v	(0.302) «-«	-	-	(1.363) «-«	-	(1.457) «+«	-	-	-
GB (3; 6) s	(0.247) «-«	-	-	(1.406) «+«	-	(1.299) «-«	-	-	-
GB (3; 6) v	(0.240) «-«	-	-	(1.456) «+«	-	(1.303) «-«	-	-	-
GB (3; 4) s	(1.013) «-«	-	-	(1.373) «-«	-	(1.424) «+»	-	-	-
GB (3; 4) v	(0.509) «-«	-	-	(1.375) «-«	-	(1.302) «-»	-	-	-
Ctrl «+»	0.700- 2.600			1.400- 1.600		1.400- 1.600			
Ctrl «-»	0.09			0.09		1.09			

LITERATURA

- Allen L.J., MacGregor K.B., Koop R.S., Bruce D.H., Karner J., Bown A.W. (1999): The Relationship between Photosynthesis and a Mastoparan-Induced Hypersensitive Response in Isolated Mesophyll Cells. *Plant Physiology*, 119: 1233-1241.
- Bjorkman O., Demmig B. (1987): Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.
- Bowden R.L., Rouse D.I., Sharkey T.D. (1990): Mechanism of Photosynthesis Decrease by *Verticillium dahliae* in Potato. *Plant Physiology*, 94: 1048-1055.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.-J. (1994): Photooxydative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696-717.
- Gurney A.L., Press M.C., Ransom J.K. (1995): The parasitic angiosperm *Striga hermontica* can reduce photosynthesis of its sorghum and maize hosts in the field. *Journal of Experimental Botany*, 46: 1817-1823.
- Koh C, Noga G., Strittmatter G. (1994): Photosynthetic electron transport is differentially affected during early stages of cultivar/ race specific interactions between potato and *Phytophthora infestans*. *Plants*, 193: 551-557.
- Krause G.H., Weis E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Revue of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Peterson R.B., Aylor D.E. (1995): Chlorophyll Fluorescence Induction in Leaves of *Phaseolus vulgaris* Infected with Bean Rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiology*, 108: 163-171.
- Scholes J.D. (1992): Photosynthesis: cellular and tissue aspect in diseased leaves. in: Pests and Pathogens: plant responses to foliar attack, str. 85-106. (βios Scientific Publishers, Oxford, UK).
- Strasser, R., Srivastava, A., Govindjee (1995): Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61: 32-34.
- van Kooten O., Meurs C., van Loon L.C. (1990): Photosynthetic electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiologia Plantarum*, 80: 446-452.

(Primljeno: 08.05.2011.)

(Prihvaćeno: 29.06.2011.)

PRELIMINARY REMARKS ABOUT USE OF FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL IN PHYTOPATOLOGY IN SERBIA

NIKOLIĆ BOGDAN, IVANOVIĆ ŽARKO, ĐUROVIĆ SANJA,
STAROVIĆ MIRA, ZORAN MILIĆEVIĆ

Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia
*e-mail: bogdannik@mail2world.com

SUMMARY

Between many biochemical, microbiological, and (in contemporary time) molecular methods, all of them were broadly used in phytopathological practice in our country, we are not see use of biophysical methods for this reason, although this methods are very valuable in plant ecophysiology, as a science discipline of fundamental importance! In world literature existed examples for application biophysical methods, particularly fluorescence of chlorophyll in detection of symptoms of pathogenic attack on cultural plants *in situ*. Because of that reason we tested method of so called non-modulated fluorescence of chlorophyll for detection of physiological changes (induced by phytopathological factors) on two cultivars of grapevine (*Vitis vinifera* L): Game Bojadiser and Frankovka, infected by plant viruses. Existence of those viruses also detected by common microbiological methods.

Key words: non-modulated fluorescence of chlorophyll, grapevine, Game Bojadiser, Frankovka, plant viruses.

(Received: 08.05.2011.)

(Accepted: 29.06.2011.)