

АГРОНОМИЯ

УДК 633.632. 2:576.38

DOI:10.31677/2072-6724-2019-53-4-7-14

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО МИКРОАНАЛИЗА
В ФИТОПАТОЛОГИИ

Л. Ф. Ашмарина, доктор сельскохозяйственных наук

А. А. Сухоруков, научный сотрудник

А. С. Коробейников, кандидат сельскохозяйственных наук

Т. А. Галактионова, научный сотрудник

Сибирский научно-исследовательский институт кормов

СФНЦА РАН

E-mail: alf8@yandex.ru

Ключевые слова: рентгеновский микроанализ, макроэлементы, магний, фосфор, сера, калий, кальций, болезни растений, бактериальный ожог, аскохитоз, антракноз, соя

Реферат. *В настоящее время методы рентгеновского микроанализа значительно расширили функциональные возможности электронной микроскопии. Рентгеновский микроанализ широко используется в работах по физиологии растений. Так, нами был изучен механизм функционирования устьичного аппарата кормовых бобов (*Vicia faba* L.). Регуляция работы устьиц зависит от концентрации калия в их замыкающих клетках. Было изучено заражение мучнистой росой (*Erysiphe graminis* DC) листьев пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и получены данные по изменению элементного состава тканей в зоне поражения. Эта информация позволила выяснить роль различных элементов в развитии инфекционного процесса при заражении мучнистой росой растений пшеницы. В статье обобщены материалы по использованию рентгеновского микроанализа в фитопатологии. С его помощью выявлено участие кальция в формировании механизма захвата нематоды в разновозрастных колониях хищных грибов *Arthrobotrys oligosporos* Fres. Получены данные о наличии в корнях пшеницы тканевого барьера, где осуществляется контроль транспорта как засоряющих элементов натрия и хлора, так и макроэлементов калия и кальция. Было показано, что транспорт этих элементов регулируется с помощью активных механизмов в клетках эндодермы. В настоящей работе представлены результаты рентгеновского микроанализа по определению содержания элементов магния, фосфора, серы, калия, кальция в листьях сои, пораженных разными болезнями. Выявлены изменения в содержании калия, кальция, магния и фосфора в листьях с бактериальным ожогом, аскохитозом и альтернариозом. Обсуждается участие элементов в формировании устойчивости растений к болезням и роль этих элементов в физиологии инфекционного процесса.*

X-RAY MICROANALYSIS IN PHYTOPATHOLOGY

Ashmarina L.Ph., Doctor of Agricultural Sc.
 Sukhorukov A.A., Research Fellow
 Korobeinikov A.S., Candidate of Agriculture
 Galaktionova T.A., Research Fellow

Siberian Research Institute of Fodders Siberian Federal Research Centre
 of Agricultural Biotechnologies RAS

Key words: x-ray microanalysis, macroelements, magnesium, phosphorus, sulfur, potassium, calcium, plant diseases, bacterial blight, black stem, pod spot, soya.

Abstract. X-ray microanalysis methods have significantly expanded the functionality of electron microscopy. X-ray microanalysis is widely applied in activities, which deal with plant physiology. The paper explores the functioning of the stomatal apparatus of fodder beans (*Vicia faba*). The regulation of the stomatal function depends on the potassium concentration in the closing cells. The authors investigated the infestation of wheat leaves with mildew (*Erysiphe graminis*) (*Triticum aestivum*) and obtained the data that reveal the changes in the elemental composition of tissues in the affected area. This has contributed to find out the role of various elements during the infectious process in case of wheat plants with powdery dew contamination. The paper summarizes the materials on the application of X-ray microanalysis in phytopathology. It stipulates the participation of calcium in the formation of the mechanism of nematode capture in different age colonies of predatory fungi *Arthrobotrys oligosporus* Fres was revealed. The data on tissue barrier in wheat roots, where the transport of both sodium and chlorine salting elements and potassium and calcium macro elements is controlled, are obtained. The authors show that transporting of these elements is regulated by active mechanisms in the endoderm cells. The article demonstrates the results of X-ray microanalysis aimed at determining the content of elements of magnesium, phosphorus, sulfur, potassium and calcium in soybean leaves affected by various diseases. The authors observed the changes in potassium, calcium, magnesium and phosphorus concentration in leaves with bacterial burn, ascochytirosis and alternative. They argue the participation of elements in formation of plant resistance to disease and the role of these elements in the physiology of the infectious process.

Использование рентгеновского микроанализа (РМА) позволяет связать цитологические исследования с физиологией и биохимией на тканевом, клеточном и субклеточном (цитоплазма, ядро, вакуоли и др.) уровнях [1–4]. Качественный и количественный элементный состав клеток растений изменяется под воздействием болезней (грибных и бактериальных) [1–3]. РМА позволяет получать данные о содержании элементов в клетках растений с высоким количественным разрешением (10^{-20} г) и о пространственной локализации элементов с точностью 20–40 нм [4].

РМА элементного состава тканей корня растений – паренхимы, эндодермы (рис. 1) – позволил изучить транспорт засоряющих

элементов (натрия, хлора) и калия, кальция к проводящим сосудам корня. Определено, что активный транспорт калия и кальция осуществляется через эндодерму, а натрий и хлор выводятся из нее в паренхиме активным транспортом [5, 6].

Изучение элементного состава тканей корня пшеницы позволило выявить функциональную роль тканей корня в солеустойчивости растений и транспорте калия и кальция.

На засоленных почвах не выявлено увеличения засоряющих элементов (натрия, хлора, серы) в тканях корня, что указывает на отсутствие засоления почвенного раствора на солонцах [7], поэтому угнетение развития растений пшеницы здесь связано с механическими

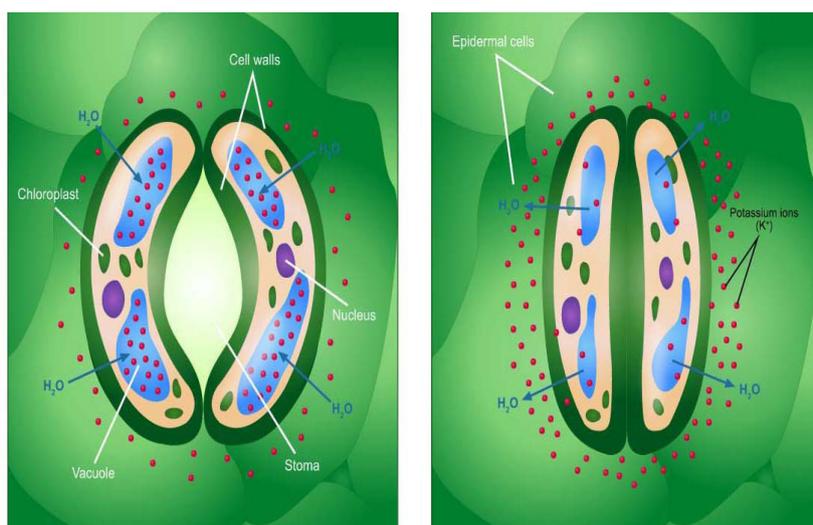


Рис. 1. Структура корня в зоне корневых волосков
 (https://i.pinimg.com/originals/9d/f3/51/9df3514e75c2a0417a29350102c5abb2.gif)
 Root structure of root zone of root hairs
 (https://i.pinimg.com/originals/9d/f3/51/9df3514e75c2a0417a29350102c5abb2.gif)

свойствами солонцов. Кормовые культуры, имеющие мощную корневую систему, способны успешно развиваться на солонцовых почвах (донник, костер, люцерна и др.) [8].

С помощью РМА изучалось функционирование устьиц листьев кормовых бобов *Vicia faba* L. и определялось содержание

калия в замыкающих клетках устьичного аппарата. Пониженное содержание калия приводило к уменьшению осмотического давления в замыкающих клетках за счет выхода воды в межклеточное пространство и к открытию устьичной щели (рис 2, а). Повышенное содержание калия в замыка-



а б

Рис. 2. Схема работы устьичного аппарата: а) открытое устьице с набухшими замыкающими клетками; б) закрытое устьице со сморщенными замыкающими клетками
 Process of stomatal device operation: a) open mouth with swollen closing cells; b) a closed stomach with wrinkled closing cells

ющих клетках вызывало поступление воды из межклеточного пространства, набухание замыкающих клеток и закрытие устьичной щели (см. рис. 2, б) [9].

Было изучено содержание элементов в гифах хищного гриба *Arthrobotrys oligosporus* Fresen. (рис. 3) в молодой, зрелой и старой колониях. Содержание кальция в зрелой коло-

нии было в 2–3 раза больше, чем в молодой, и до 40 раз больше, чем в старой [1].

Выявлено, что высокое содержание кальция является маркером так называемых «моторных белков», участвующих в захвате нематоды ловчими сетями хищного гриба [1].

РМА позволяет получать количественные и качественные данные по распределению эле-



Рис.3. Нематода, пойманная ловчими петлями гриба рода *Arthrobotrys oligosporus* (http://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch15_06.htm)
Nematode, caught by the fungus loops of *Arthrobotrysoligosporus* (http://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch15_06.ht)

ментов на тканевом и клеточном уровнях. Эта информация по элементному составу различных биологических объектов является основой для решения физиологических и биохимических задач. Физиологический подход к вопросам фитопатологии – это перспективное направление в исследованиях инфекционного процесса на сельскохозяйственных растениях.

Цель исследований – выявить отличия элементного состава в листьях растений при различных инфекционных заболеваниях на примере сои.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования были гербарные образцы листьев сои *Glycine max* L. сорта СибНИИК-315, собранные в фазу завязыва-

ния плодов в 2018 г. в селекционных питомниках СибНИИ кормов СФНЦА РАН, здоровые и пораженные альтернариозом (индекс развития болезни –10–15%), бактериальным ожогом (до 20%) и аскохитозом (до 15%) [10]. При подготовке к рентгеновскому микроанализу образцы напыляли слоем углерода 30–40 нм. Для РМА использовали сканирующий электронный микроскоп LEO 1430 VP, оснащенный энергодисперсионным рентгеновским детектором OXFORD. РМА проводили при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе электронного зонда 15 нА, времени фиксации рентгеновского излучения 20 с. Данные со сканирующего электронного микроскопа обрабатывались с помощью программы Incapture Exreportver. 3.14.06 (разработчик – Н.С. Карманов, ИГМ СО РАН). Статистическую обработку данных метода-

ми описательной статистики осуществляли в программе Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определен элементный состав листьев сои, пораженных бактериальным ожогом, аскохитозом и альтернариозом (рис. 4, 5).

Для анализа были использованы калий, кальций, магний, фосфор и сера, являющиеся важнейшими в физиологии и биохимии клеток растений (табл. 1).

Содержание элементов в листьях сои было неодинаковым при различных болезнях (табл. 2), что, по-видимому, отражает защитную реакцию растения на возбудителей болезней.

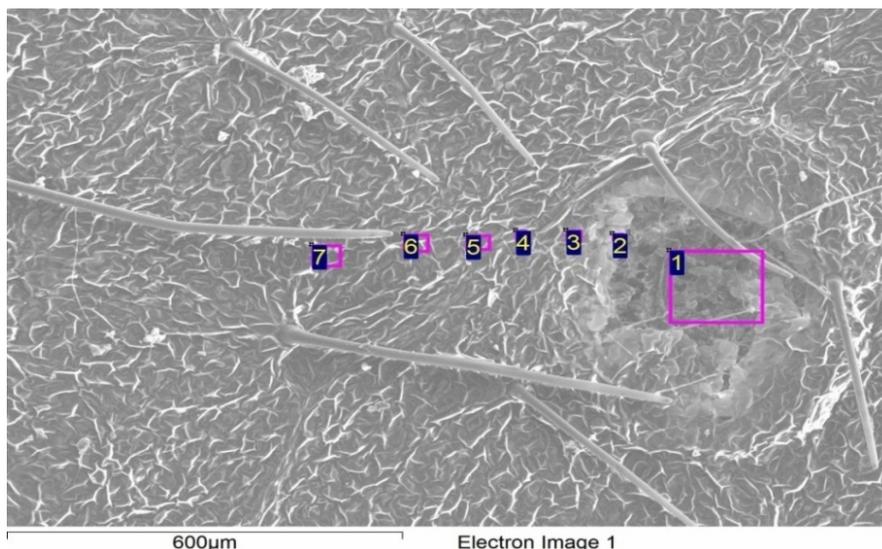


Рис. 4. Лист сои, пораженный альтернариозом
Soya bean leaf affected by the blackspot

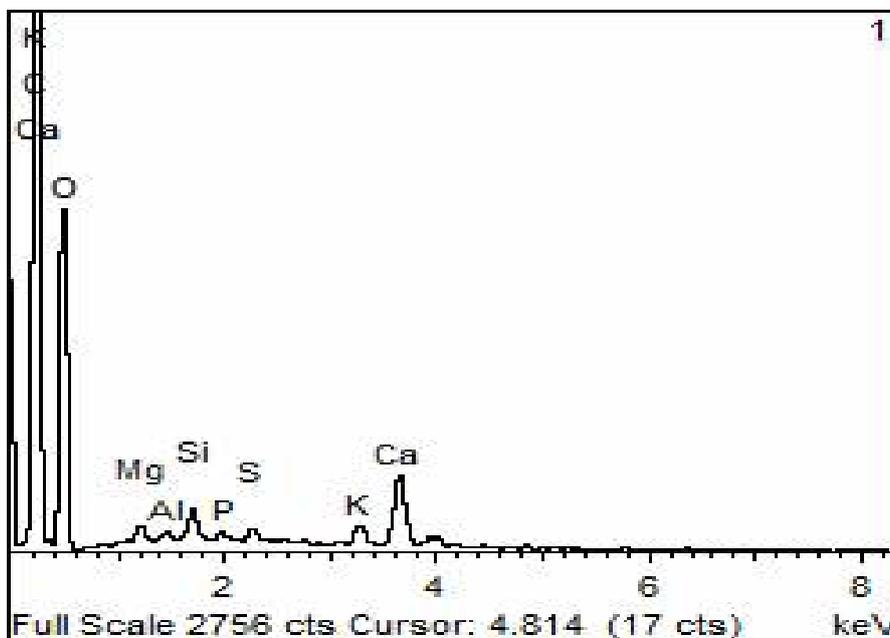


Рис. 5. Элементный состав площадки № 1 листа сои, пораженного альтернариозом: ось абсцисс – энергия рентгеновского излучения, кэВ; ось ординат – интенсивность рентгеновского излучения

Elements concentration in area 1 of the soyabean leaf affected by the blackspot:
x-axis - X-ray energy, kW; y-axis – X-ray intensity

Таблица 1

Элементный состав площадок листа сои, пораженного альтернариозом
Elements concentration in the areas of soyabean leaf affected by blackspot

Номер площадки	Содержание элементов, % от массы				
	магний	фосфор	сера	калий	кальций
1	0,27	0,14	0,2	0,4	1,64
2	0,38	0,16	0,13	0,53	1,74
3	0,92	0,14	0,14	0,63	1,87
4	1,03	-	0,13	0,75	6,61
5	0,97	0,14	0,1	0,66	4,3
6	0,76	0,22	-	0,68	2,38
7	0,84	0,15	0,12	0,62	3,55

Таблица 2

Количество элементов в листьях сои, пораженных болезнями
The number of elements in the soyabean leaves affected by diseases

Болезни листьев	Количество элементов, % от массы				
	магний	фосфор	сера	калий	кальций
Бактериальный ожог	0,69 ± 0,13	0,54 ± 0,21	0,18 ± 0,03	1,80 ± 0,43	1,60 ± 0,23
Аскохитоз	1,47 ± 0,22	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,93 ± 0,05	1,14 ± 0,14
Альтернариоз	0,74 ± 0,12	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,61 ± 0,05	3,16 ± 0,74

При самом низком содержании калия в листьях сои, пораженных альтернариозом (0,61%), отмечен наиболее высокий уровень кальция (3,61%). В зависимости от болезни изменение содержания калия (в 3 раза) и кальция (в 2 раза) указывает на отличия в метаболизме при поражении листьев разными инфекционными заболеваниями.

Содержание магния и фосфора также менялось в зависимости от болезни, например, изменение количества фосфора близко к трехкратному.

В отличие от других макроэлементов, содержание серы слабо менялось в зависимости от болезней.

Все изучаемые элементы участвуют в метаболизме растений, а калий, кальций и магний также и в формировании осмотического давления в вакуолях растительных клеток [11, 12]. Содержание калия, кальция, магния и фосфора при различных заболеваниях изменялось 2–3-кратно и, по-видимому, эти элементы можно использовать для изучения инфекционного процесса в растениях на тканевом и клеточном уровнях.

Необходимо отметить, что до 90% объема растительной клетки составляет вакуоль,

которая играет основную функциональную роль в изменении элементного состава растительной клетки [13]. Более 90% массы представленных в настоящей работе элементов составляют калий и кальций. По-видимому, обнаруженные изменения соотношений этих элементов под воздействием различных возбудителей болезней происходят в вакуоли.

ВЫВОДЫ

1. Содержание элементов в тканях листьев сои показало существенные отличия реакций растений на воздействие фитопатогенов (бактериальный ожог, аскохитоз, альтернариоз).

2. Выявлены изменения в содержании калия, кальция, магния и фосфора в тканях листьев сои при разных болезнях растений.

3. Содержание серы не отличается в листьях сои, зараженных бактериальным ожогом, аскохитозом и альтернариозом, которые, по-видимому, не затрагивают метаболизм серы.

4. РМА позволяет изучать инфекционный процесс через элементный состав тканей и клеток пораженных листьев растений, что расширяет и углубляет возможности исследований в фитопатологии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Сухоруков А. А., Теплякова Т. В., Беккер З. Э. Исследование ловчих колец хищного гриба *Arthrobotrys oligosporos*, штамма Х1Х 4/27 методами РМА и СЭМ // Микроорганизмы в защите растений. – Кишнев: Штиинца, 1985. – С. 63–68.
2. Коробейников А. С., Ашмарина Л. Ф. Использование энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии в ранней диагностике болезней кормовых культур // Молодой ученый. – 2015. – № 9 – С. 33–34.
3. Коробейников А. С., Ашмарина Л. Ф. Использование энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии в защите растений // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2014. – № 6. – С. 66–70.
4. Сухоруков А. А., Погорелов А. Г., Аллахвердов Б. Л. РМА растительных объектов // Тез. Всесоюз. конф. по РМА. – Черногловка: ОИХФ АН СССР, 1979. – С. 112–115.
5. Сухоруков А. А. Использование РМА для изучения солеустойчивости пшеницы // Тез. докл. Всесоюз. симп. по устойчивости растений. – Л., 1981. – Т. 2. – С. 91–93.
6. Сухоруков А. А. Влияние засоления на распределение калия и натрия в тканях корня пшеницы // Науч.-техн. бюл. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1980. – Вып. 1. – С. 82–86.
7. Сухоруков А. А. Элементный состав тканей растений овса и пшеницы на солонцах // Науч.-техн. бюл. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1983. – Вып. 20. – С. 53–57.
8. Кухарь М. А., Сухоруков А. А. Роль многолетних трав при освоении солонцов // Резервы лугопастбищного хозяйства Сибири и Дальнего Востока: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1983. – С. 85–94.
9. Михеев В. А. Функциональные особенности устьичной транспирации и пути ее регулирования: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1983. – 20 с.
10. *Energy-Dispersive X-Ray Microanalysis of Elements' Content of Medicinal Plants Used Traditionally as Anticancer Cure* / S.I. Abdelwahab, N.M. Ain, A.B. Abdul, M.M. Elhassan, T.A. Tengku-Ibrahim // *Research Journal of Biological Sciences*. – 2009. – Vol. 4 (5). – P. 547–549.
11. *Komsic-Buchmann K., Wöstehoff L., Becker B. The contractile vacuole as a key regulator of cellular water flow in Chlamydomonas reinhardtii* // *Eukaryotic Cell*. – 2014. – Vol. 13 (11). – P. 21–1430. – URL: <https://doi.org/10.1128/EC.00163-14>.
12. *Regulatory Aspects of the Vacuolar CAT2 Arginine Transporter of S. lycopersicum: Role of Osmotic Pressure and Cations* / J. Cosco, T.M.R. Regina, M. Scalise, M Galluccio, C. Indiveri // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20 (4). – P. 906. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20040906>.
13. *Ion micro-distribution in varying aged leaves in salt-treated cucumber seedlings* / Hai-Ping Hao, Hui Li, Chuang-Dao Jiang, Yu-Dan Tang, Lei Shi // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 129. – P. 71–76.

REFERENCES

1. Sukhorukov A.A., Teplyakova T.V., Bekker Z.E. *Mikroorganizmy v zashchiterastanii* (Microorganisms in plant protection), Kishenev, Shtinitza, 1985, pp. 63–68.
2. Korobeinikov A.S., Ashmarina L.F. *Molodoiuchenyi*, 2015, No 9, pp. 33–34. (In Russ.)
3. Korobeinikov A.S., Ashmarina L.F. *Sib. vestnik s. – kh.nauki*, 2014, No 6, pp. 66–70. (In Russ.)
4. Sukhorukov A.A., Pogorelov A.G., Allakhverdov B.L. *Tezisy Vsesoyuznoikonferentsiipo RMA* (Abstracts of Papers of the All-Union Conference on the RMA), Chernogolovka, OIKhF AN SSSR, 1979, pp. 112–115. (In Russ.)

5. Sukhorukov A.A. *Tezisys doklado Vsesoyuznogo simpoziuma po ustoichivosti rastenii* (Theses of Papers of the All-Union symposium on plant resistance), Leningrad, 1981, Vol. 2, pp. 91–93. (In Russ.)
6. Sukhorukov A.A. *Nauchno-tekhnicheskii byulleten»* (Scientific and Technical Bulletin), VASKhNIL, Sib. otd-nie, Novosibirsk, SO VASKhNIL, 1980, Issue 1, pp. 82–86.
7. Sukhorukov A.A. *Nauchno-tekhnicheskii byulleten»* (Scientific and Technical Bulletin), VASKhNIL, Sib. otd-nie, Novosibirsk: SO VASKhNIL, 1983, Issue 20, pp. 53–57.
8. Kukhar' M.A., Sukhorukov A.A. *Rezervy lugopastbishchnog okhozyaistva Sibiri I Dal'nego Vostoka* (The reserves of the grassland economy of Siberia and the Far East), VASKhNIL, Sib. otd-nie, Novosibirsk, SO VASKhNIL, 1983, pp. 85–94.
9. Mikheev V.A. *Funktsional'nye osobennosti ust'ichnoi transpiratsii i putieeregulirovaniya* (Functional features of stomatal transpiration and ways of its regulation), Novosibirsk, 1983, 20 p.
10. Abbdelwahab S.I., Ain N.M., Abdul A.B., Elhassan M.M., Tengku-Ibrahim T.A. Energy-Dispersive X-Ray Microanalysis of Elements' Content of Medicinal Plants Used Traditionally as Anticancer Cure, *Research Journal of Biological Sciences*, 2009, Vol. 4 (5), pp. 547–549.
11. Komsic-Buchmann K., Wöstehoff L., Becker B. The contractile vacuole as a key regulator of cellular water flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryotic Cell*, 2014, Vol. 13 (11), pp. 1421–1430. <https://doi.org/10.1128/EC.00163-14>.
12. Cosco J., Regina T.M.R., Scalise M., Galluccio M., Indiveri C. R egulatory Aspects of the Vacuolar CAT2 Arginine Transporter of *S. lycopersicum*: Role of Osmotic Pressure and Cations, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, Vol. 20 (4), 906 p. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20040906>.
13. Hao Hai-Ping, Li Hui, Jiang Chuang-Dao, Tang Yu-Dan, Shi Lei Ion micro-distribution in varying aged leaves in salt-treated cucumber seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, Vol. 129, pp. 71–76.