

ИЗУЧЕНИЕ БОЛЕЗНЕЙ КЛЕВЕРА С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОВСКОГО МИКРОАНАЛИЗА

А. А. Сухоруков, Л. Ф. Ашмарина

Сибирский научно-исследовательский институт кормов (СибНИИ кормов) СФНЦА РАН

630501, Россия, Новосибирская обл., Краснообск

e-mail: alf8@yandex.ru

Аннотация. Настоящая работа посвящена изучению влияния фитопатогенов на макроэлементный состав тканей листьев различных видов клевера, выращенных в полевых условиях. Отмечены значительные колебания содержания макроэлементов калия и кальция в тканях листьев различных видов клевера, пораженных фитопатогенами. Наивысшее содержание макроэлемента калия и наименьшее кальция отмечалось в тканях листьев здоровых растений клевера. У пораженных растений клевера фитопатогенами содержание калия снижалось и кальция возрастало в тканях листьев растений. Данные макроэлементы оказались маркерами физиологического состояния устойчивости растений клевера к фитопатогенам. Под воздействием фитопатогенов изменялись взаимосвязи между макроэлементами, что указывало на нарушение проницаемости мембран клеток листьев и на нарушение метаболизма изучаемых макроэлементов. Рентгеновский микроанализ (РМА) открыл возможность исследования повреждающего воздействия различных фитопатогенов по изменению макроэлементного состава листьев растений клевера.

Ключевые слова: клевер горный, средний, красноватый, стемфилиоз, альтернариоз, вирусная мозаика, макроэлементы

STUDYING THE CLOVER DISEASES USING X-RAY MICROANALYSIS

A. A. Sukhorukov, L. F. Ashmarina

Siberian Research Institute of Fodder

Krasnoobsk town, Novosibirsk Region, 630501, Russia

e-mail: alf8@yandex.ru

Annotation. This work is devoted to studying the effect of phytopathogens on the macronutrient composition of leaf tissues of clover various species grown under field conditions. The authors note significant fluctuations of the potassium and calcium macroelement content in leaf tissues of clover different species affected by phytopathogens. The highest content of the macronutrient potassium and the lowest one of calcium have been found in the leaf tissues of healthy clover plants. The content of potassium decreased and the calcium content increased in the tissues of plant leaves of plants affected by phytopathogens. These macronutrients turned out to be markers of the physiological state of clover resistance to phytopathogens. The relationships between macronutrients changed under the phytopathogen impact, which indicated impaired permeability of leaf cell membranes and impaired metabolism of the studied macronutrients. X-ray microanalysis (RMA) has opened the possibility to study the damaging effect of various phytopathogens by changing the macroelement composition of clover leaves.

Keywords: mountain clover, medium, reddish, stemphiliosis, alternaria, viral mosaic, macronutrients

Введение

В Западной Сибири на различных кормовых культурах распространен комплекс болезней [1; 2]. Развития болезней на различных видах клевера в различных по природно-климатическим условиям вегетационных периодах негативно влияют на урожайность и на качество получаемых кормов, что вызывает необходимость изучения их патогенеза.

Элементный состав тканей и клеток растений являются важной составляющей клеточных компартментов (цитоплазма, вакуоль и др.). В настоящее время использование РМА позволило получать данные по элементному составу биологических объектов на тканевом, клеточном и субклеточном уровне [3–7]. Это открыло новые функциональные возможности рентгеновского микроанализа в изучение

элементного состава тканей растений клевера, пораженных фитопатогенами.

Большую роль в гомеостазе тканей и клеток растений играют макроэлементы калий и кальций, которые составляют более 90% элементов растительных объектов [4; 5; 8]. Исследование элементного состава тканей растений клевера позволяет изучить механизмы защиты от фитопатогенов. Работы по РМА элементного состава тканей растений расширяют и углубляют возможности выявления механизмов устойчивости растений к фитопатогенам и другим повреждающим факторам. РМА является эффективным и перспективным методом для изучения влияния элементного состава тканей растений на устойчивость к возбудителям заболеваний. Исследования по элементному составу клевера и других кормовых культур позволило выявить значительные

изменения взаимосвязей между макроэлементами под влиянием фитопатогенов. Использование РМА при изучении элементного состава тканей растений открывают новые возможности исследования механизмов устойчивости растений к биотическим факторам, включая грибные, бактериальные, вирусные и другие инфекционные болезни растений.

Изучение элементного состава тканей и клеток пораженных растений клевера позволяет рассматривать вопросы устойчивости растений к инфекционным болезням на новом инструментальном уровне с использованием РМА. Работы по фитопатологии с применением РМА расширяют и углубляют возможности изучения устойчивости растений не только к фитопатогенам, но и к другим повреждающим факторам [7]. Как правило, для фиксации растительных образцов для РМА использовали криогенные методики, что существенно затрудняло его использование в полевых опытах. В настоящей работе для решения данного вопроса использовались листья растений клевера в виде гербарных образцов [11; 12].

Рентгеновский микроанализ позволяет на разных стадиях развития болезни исследовать качественные и количественные изменения макроэлементного состава (K, Ca, Mg и др.) тканей инфицированных растений различных видов клевера. Также в настоящее время РМА используется для исследования физиологических аспектов изменения метаболизма растений при поражении фитопатогенными грибами, бактериями, вирусами и др.) [3–6].

В связи с этим целью наших исследований было исследование элементного состава тканей и клеток пораженных растений клевера с использованием РМА.

Материал, методика и условия исследований

Объекты исследований: виды клевера горный (*Trifolium montanum* L.) и клевер средний (*Trifolium medium* L.), клевер красноватый (*Trifolium rubens* L.); болезни: стеμφилиоз (*Stemphylium sarcinaeforme*), альтернариоз (*Trifolium pratense* L.), вирусная мозаика (*mosaic of clover*); макроэлементы: магний, фосфор, сера, калий и кальций здоровых и пораженных листьев растений клевера. Для исследований использовались растительные образцы одного срока сбора и с одного полевого опыта. В работе по РМА использовали растения с полевых опытов гербарные образцы [11; 12]. Исследования проводились на сканирующем электронном микроскопе JSM 6510 LV (Япон): ускоряющее напряжение – 20 кВ, время регистрации рентгеновского излучения – 20 сек; ток электронного зонда – 15 нА и энергодисперсионный детектор OXFORD X-Maks 80. Полученные данные обрабатывались с помощью программы Incapture Export 3.14.06. Статистическую обработку данных методами описательной статистики осуществляли в программе MS EXCEL.

Результаты

При поражении листьев растений клевера среднего альтернариозом содержание калия изменялось по сравнению с контрольными растениями незначительно, но достоверно увеличивалось содержание кальция (рис. 1, 2).

Коэффициент корреляции между калием и кальцием при переходе от здорового растения клевера к больному возрастал от $r = -0,5$ до $r = -0,2$ (рис. 3, 4,

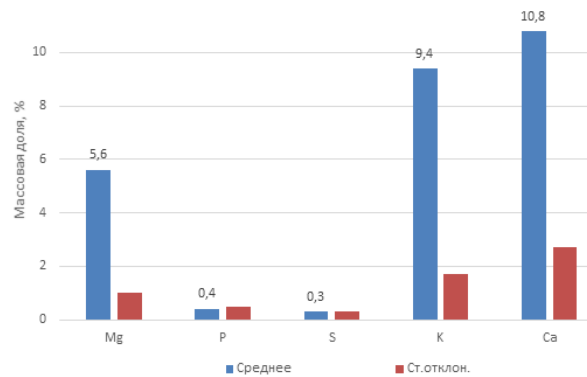


Рис. 1. Среднее значение и стандартное отклонение макроэлементов в тканях листьев клевера среднего – альтернариоз (дата отбора – 02.07.19)

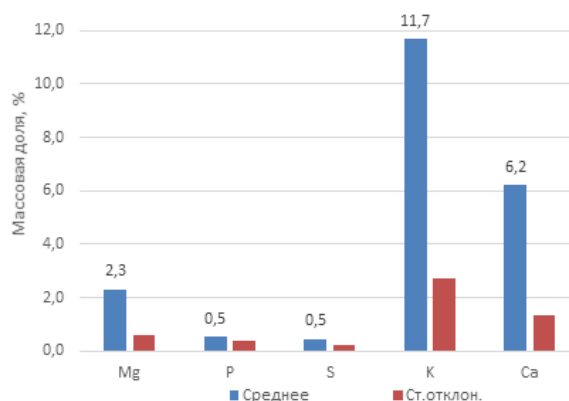


Рис. 2. Среднее значение и стандартное отклонение макроэлементов в тканях листьев клевера среднего – контроль (дата отбора – 02.07.19)

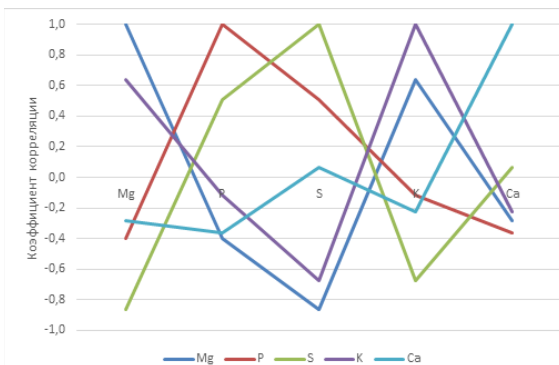


Рис. 3. Коэффициенты корреляции между макроэлементами в тканях листьев клевера среднего – альтернариоз (дата отбора – 02.07.19)

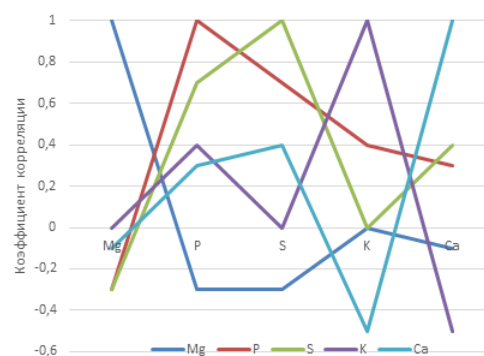


Рис. 4. Коэффициенты корреляции между макроэлементами в тканях листьев клевера среднего – контроль (дата отбора – 02.07.19)

$R=0,95$). Корреляция между калием и кальцием давала качественную характеристику метаболизма тканей растений клевера. Если в здоровых тканях и клетках растений изменение содержания калия и кальция происходило разнонаправленно, что выразилось в отрицательном коэффициенте корреляции, то под влиянием возбудителя альтернариоза отмечалось снижение отрицательного значения коэффициента корреляции в листьях растений клевера среднего. Изменялось отношение содержания калия к кальцию (K/Ca) при переходе от здоровых листьев растений клевера среднего при поражении альтернариозом – снижалось в 2 раза (K/Ca здоровый=1,89; K/Ca –стемфилиоз=0,97). Отношение K/Ca отражало изменения метаболизма в тканях листьев клевера среднего под воздействием возбудителя болезни.

На рисунках 5, 6 представлено распределение содержания калия и кальция в тканях листьев клевера горного, больных стемфилиозом, и здоровых растений. Рентгеновский микроанализ показал, что при переходе от листьев здорового растения клевера к больному возрастало незначительно содержание калия, кальций при этом возрастал в два раза (рис. 1).

Отношение содержания в листьях клевера горный K/Ca у здоровых растений клевера горного составляло 1,95, тогда как у больных стемфилиозом растений в два раза меньше (0,97). Коэффициент корреляции между калием и кальцием в листьях здоровых растений $-0,8$, у больных стемфилиозом листьев

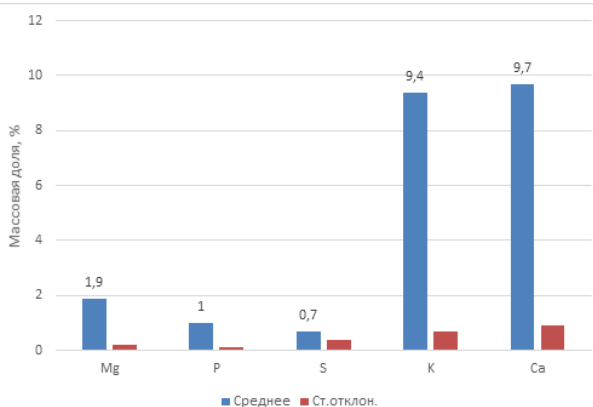


Рис. 5. Среднее значение и стандартное отклонение макроэлементов в тканях листьев клевера горного – стемфилиоз (дата отбора – 09.07.19)

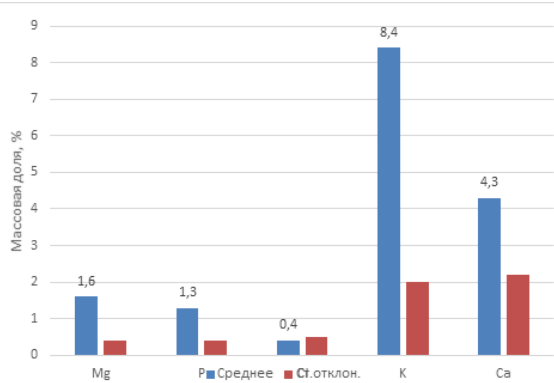


Рис. 6. Среднее значение и стандартное отклонение макроэлементов в тканях листьев клевера горного – контроль (дата отбора – 09.07.19)

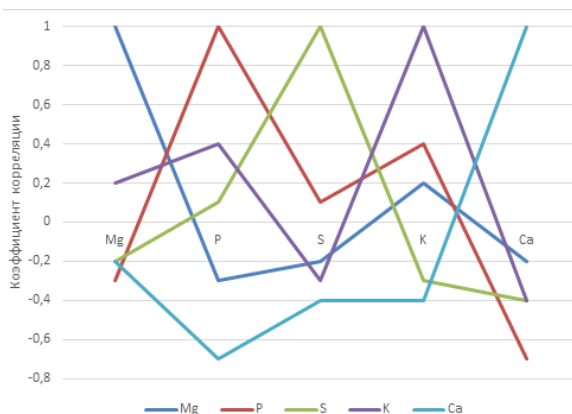


Рис. 7. Коэффициенты корреляции между макроэлементами в тканях листьев клевера горного – стемфилиоз (дата отбора – 09.07.19)

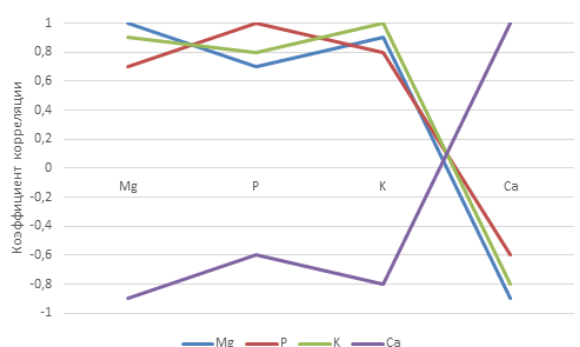


Рис. 8. Коэффициенты корреляции между макроэлементами в тканях листьев клевера горного – контроль (дата отбора – 09.07.19)

растений клевера горного $-0,4$ (рис. 7, 8). Установлено изменение состава макроэлементов у пораженных стемфилиозом растений, так содержание кальция (возрастало в 2 раза), отношение содержания калия к кальцию (K/Ca) также возрастало в 2 раза (K/Ca здоровое=1,89; K/Ca стемфилиоз=0,87). Таким образом, воздействие стемфилиоза на ткани листьев клевера горного проявлялось более выражено, чем у клевера среднего от болезни альтернариоз. При поражении листьев клевера стемфилиозом происходило изменение трех параметров, а именно: возрастало содержание кальция в два раза, снижалось в два раза отношение содержания калия к кальцию (K/Ca), и в два раза уменьшалась отрицательная корреляция содержания между калием и кальцием в листьях. Таким образом, был выявлен у клевера горного в листьях растений дополнительный параметр отражающих негативное влияние фитопатогенов на метаболизм тканей растений: возрастание содержания кальция в два раза в листьях под влиянием фитопатогена. Необходимо отметить сходство кривых коэффициентов корреляции в тканях листьев клевера горного у контрольных растений по магнию, фосфору и калию (рис. 8).

Отмечалось также возрастание кальция под влиянием вирусной мозаики.

Установлено сходство кривых коэффициентов корреляции в тканях листьев клевера горного здоровых растений по магнию, фосфору и калию (рис. 8). Подобное отмечено в тканях листьев здоровых растений клевера красноватого (рис. 10). Содержание

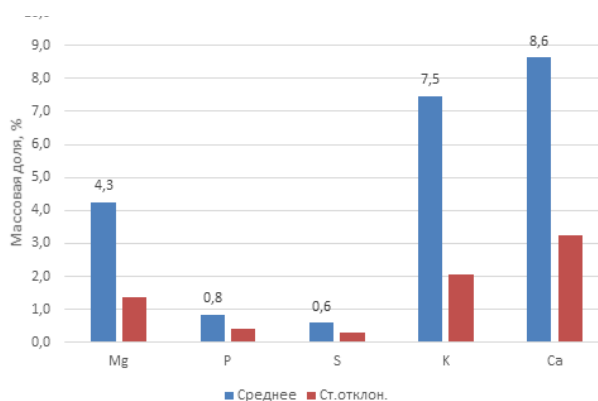


Рис. 9. Среднее значение и стандартное отклонение макроэлементов в тканях листьев клевера красноватого – контроль (дата отбора – 09.07.19)

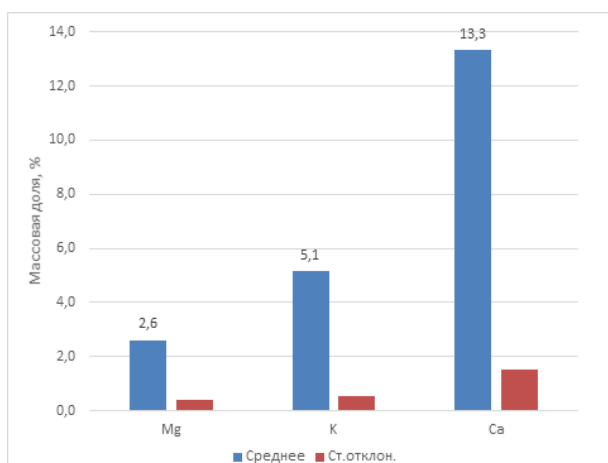


Рис. 10. Среднее значение и стандартное отклонение макроэлементов в тканях листьев клевера красноватого – вирусная мозаика (дата отбора – 09.07.19)

калия и кальция в тканях листьев клевера красноватого изменялось, как и у клевера среднего, под влиянием фитопатогенов. Но изменения содержания калия в листьях клевера красноватого были достоверны, в отличие от клевера среднего (рис. 1).

В результате проведенных исследований установлено уменьшение отрицательного значения коэффициента корреляции между содержанием калия и кальция в листьях клевера красноватого под воздействием вирусной мозаики с $r = -0,7$ до $r = +0,4$ (рис. 9, 10). Изменения коэффициента корреляции между калием и кальцием в листьях клевера красноватого значительно превышали, что было выявлено в тканях листьев клевера среднего под воздействием возбудителя альтернариоза ($r = -0,5$ до $r = -0,2$) (рис. 3, 4). При поражении листьев клевера красноватого вирусной мозаикой отношение содержания калия к кальцию (K/Ca) снижалось с 0,88 до 0,38. При поражении листьев клевера красноватого вирусной мозаикой изменялись три параметра, связанных с содержанием калия и кальция: уменьшалось содержание калия и более чем в два раза снижалось отношение содержания калия к кальцию (K/Ca) и коэффициент корреляции между содержанием калия с кальцием изменялся от $r = -0,7$ до $r = +0,4$ (рис. 11, 12). Таким образом, было отмечено изменение трех

параметров, отражающих негативное влияние фитопатогенов (антракноз, стебфиллиоз, вирусная мозаика) на метаболизм тканей листьев различных видов клевера (2, 4). Полученные результаты показали как общие черты негативного воздействия различных фитопатогенов на разные виды клевера, так и некоторые отличия в калий-кальциевом обмене в тканях листьев. Кроме того, под влиянием вирусной мозаики содержание фосфора и серы снижалось ниже уровня чувствительности детектора рентгеновского излучения. Графики кривых коэффициентов корреляции листьев клевера красноватого в тканях здоровых растений в отношении магния, фосфора и калия были схожи (рис. 11). Изменения кривых коэффициентов корреляции в тканях листьев клевера красноватого серы и кальция было аналогичным (рис. 11).

Коэффициент корреляции между макроэлементами калием и кальцием изменили полярность с отрицательного значения $r = -0,7$ до $r = +0,4$ в растениях, инфицированных вирусной мозаикой. Это отражает изменение транспортных процессов в тканях листьев клевера красноватого под воздействием этого заболевания (рис. 11, 12).

Выводы

1. Под влиянием фитопатогенов происходило снижение содержания в больных клетках всех видов клевера калия и возрастание кальция. Отношение содержания калия к кальцию (K/Ca) при поражении фитопатогенами у всех изученных видов клевера снижалось в 2 раза.

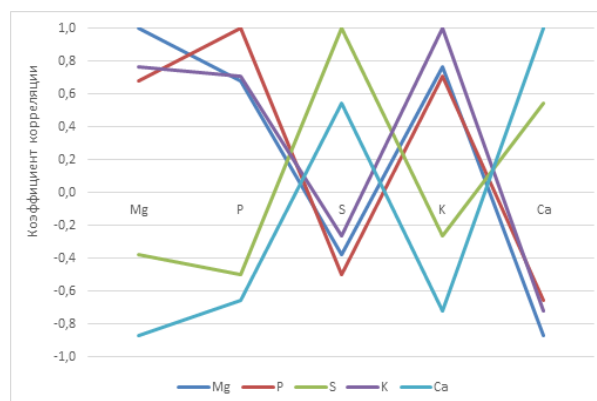


Рис. 11. Коэффициенты корреляции между макроэлементами в тканях листьев клевера красноватого – контроль

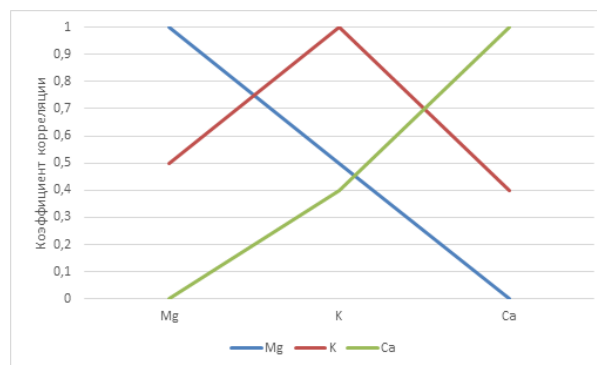


Рис. 12. Коэффициенты корреляции между макроэлементами в тканях листьев клевера красноватого – вирусная мозаика

2. Коэффициенты корреляции между содержанием калия и кальция в листьях растений под влиянием фитопатогенов изменялись с отрицательных значений – до положительных: $r = -0,8$ – $r = -0,7$ до $r = -0,2$ – $r = +0,4$. Эти изменения взаимосвязей между макроэлементами указывают на негативное влияние возбудителей на метаболизм макроэлементов в тканях листьев различных видов клевера.

3. Не обнаружено специфических ответных реакций на макроэлементный состав тканей листьев разных видов клевера на воздействие различного происхождения фитопатогенов. Это предполагает наличие неспецифических ответных реакций растений клевера на фитопатогены.

Список литературы

1. Агаркова З. В., Ашмарина Л. Ф., Коняева Н. М., Горобей И. М. Болезни кормовых культур в лесостепи Западной Сибири // Кормопроизводство. 2007. № 3. С. 8–9.

2. Атлас болезней кормовых культур в Западной Сибири / ред. Н. И. Кашеваров. Новосибирск: Россельхозакадемия. Сиб. отд-ние, 2010. 179 с.

3. Cosco J., Regina T. M. R., Scalise M., Galluccio M., Indiveri C. Regulatory 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, art. 906. P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20040906>.

4. Nieves-Cordones M., Al Shiblawi F. R., Sentenac H. Roles and transport of sodium and potassium in plants // Metal Ions in Life Sciences. 2016. Vol. 16. P. 291–324. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_9.

5. Hayatsu M., Suzuki S. Electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intra- and extracellular calcium in the elongation zone of horizontally reoriented soybean roots // Microscopy. 2015. Vol. 64, № 5. P. 327–334. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfv031>.

6. Hayatsu M., Ono M., Hamamoto C., Suzuki S. Cytochemical and electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intracellular calcium in columella cells of soybean roots under simulated microgravity // Journal of Electron Microscopy. 2012. Vol. 61, № 1. P. 57–69. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfv095>.

7. Ashford A. E., Vesk P. A., Orlovich D. A., Markovina A. L., Allaway W. G. Dispersed polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis*/*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas // Fungal Genetics and Biology. 1999. Vol. 28, № 1. P. 21–33. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1140>.

8. Bücking H., Kuhn A. J., Schröder W. H., Heyser W. The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? // Journal of Experimental Botany. 2002. Vol. 53, № 374. P. 1659–1669. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf011>.

9. Storey R., Leigh R. A. Processes modulating calcium distribution in citrus leaves. An investigation using X-ray microanalysis with strontium as a tracer // Plant Physiology. 2004. Vol. 136, № 3. P. 3838–3848. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045674>.

10. Jamroskovic J., Shao P. P., Suvorova E., Barak I., Bernier-Latmani R. Combined scanning transmission X-ray and electron microscopy for the characterization of bacterial endospores // FEMS Microbiology Letters. 2014. Vol. 358, № 2. P. 188–193. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12539>.

11. Abdel-Wahab S., Ain N. M., Abdul A. B., Taha M. M. E., Azmi T., Ibrahim T. Energy-dispersive X-ray microanalysis of elements' content of medicinal plants used traditionally as anticancer cure // Research Journal of Biological Sciences. 200). № 4. P. 547–549.

12. Сухоруков А. А., Аллахвердов Б. Л., Погорелов А. Г. Рентгеновский микроанализ растительных объектов // VII Всесоюзная конференция по локальным рентгено-спектральным исследованиям и их применению: тез. докл. (28-30 нояб. 1979 г.). Черногловка, 1979. С. 115–117.

Об авторах

Сухоруков Александр Алексеевич – научный сотрудник сектора иммунитета и защиты растений
Ашмарина Людмила Филипповна – д-р с.-х. наук

About the authors

Alexander A. Sukhorukov – Researcher of the Sector of Immunity and Plant Protection
Lyudmila F. Ashmarina – Doctor of Agricultural Sciences