



УДК 632.4: 633.3

**А.С. КОРОБЕЙНИКОВ, научный сотрудник,
Л.Ф. АШМАРИНА, доктор сельскохозяйственных наук, заведующая сектором**

*Сибирский научно-исследовательский институт кормов
e-mail: alf8@yandex.ru*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭНЕРГОДИСПЕРСИОННОЙ РЕНТГЕНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Представлено обобщение иностранных литературных данных по использованию энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии в защите растений. В настоящее время основным методом учета степени пораженности растений возбудителями заболеваний является метод визуального определения, основанный на глазомерной оценке симптомов заражения по разным шкалам. Показано, что для своевременного обнаружения и доказательства участия возбудителей в патогенезе заболеваний возможно использование различных вариаций энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Проведенные с использованием этого метода предварительные исследования в Сибирском научно-исследовательском институте кормов на кормовых культурах подтвердили эту возможность. Показано, что для исследований возможно использовать гербарные образцы больных растений и для сравнения – здоровых. Выявлены количественные и качественные различия в составе элементов: так, содержание калия в больных тканях значительно выше, чем в здоровых растениях.

Ключевые слова: защита растений, фитопатоген, кормовые культуры, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, зараженность.

Одно из необходимых условий для эффективного применения средств защиты растений – обнаружение фитопатогена на ранней стадии заражения. До недавнего времени наиболее распространенным методом установления зараженности растения был метод визуального определения, основанный на глазомерной оценке симптомов заражения [1]. Однако такой метод имеет существенные недостатки. Так, он не позволяет определить факт заражения растения патогеном на ранних стадиях патологического процесса, в нем присутствует большая доля субъективности и неточности, зависящих от человеческого фактора [2].

Среди современных инструментальных средств, используемых для определения симптомов вирусных, бактериальных и грибных болезней растений, известны различные вариации энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDRS) [3]. В основе EDRS лежит способность химических элементов к испусканию спектра рентгеновского излучения под воздействием направленного пучка электронов, что позволяет определить количественное содержание определенных химических элементов в исследуемом образце.

При облучении образца электронным лучом сканирующего электронного микроскопа в точке взаимодействия происходит возбуждение атомов образца, в результате происходит выброс рентгеновского излучения опреде-

ленного спектра, которое улавливается энергодисперсионным спектрометром. Рентгеновский луч проходит через коллиматор спектрометра, сужающий его размер, и через изолирующее окно, отделяющее детектор и охлаждающий элемент от окружающей среды. Полученные данные по рентгеновским спектрам передаются на персональный компьютер для анализа с использованием специализированного программного обеспечения [4].

Использование метода рентгеноспектрального микроанализа в сочетании со сканирующим электронным микроскопом позволяет существенно повысить эффективность обнаружения химических элементов в живых тканях. Так, рентгеноспектральный микроанализ был использован для количественного анализа содержания химических элементов в тканях *Ichnocarpus frutescens*. По результатам исследования обнаружено высокое содержание в растительном гомогенате кальция и калия, что подтверждает ряд свойств растения, связанных с устранением симптомов различных заболеваний [5].

В исследованиях усвояемости калийных и кальциевых удобрений растениями мяты проведена оценка содержания калия и кальция в почве с предварительно внесенными удобрениями и тканях растений. В результате выявлены спонтанные сдвиги активности калия в тканях растений мяты и прилегающей почвы, связанные с изменением структуры и окружения химических элементов [6].

Метод EDRS также успешно использовался для экспресс-диагностики содержания калия, кальция и хлоридов в листьях ячменя при применении различных удобрений. Исследования показали различное содержание калия в молодых, зрелых и старых листьях ячменя, что позволило сделать вывод о приемлемости метода EDRS для определения потребности растений в элементах питания в разные фазы развития [7].

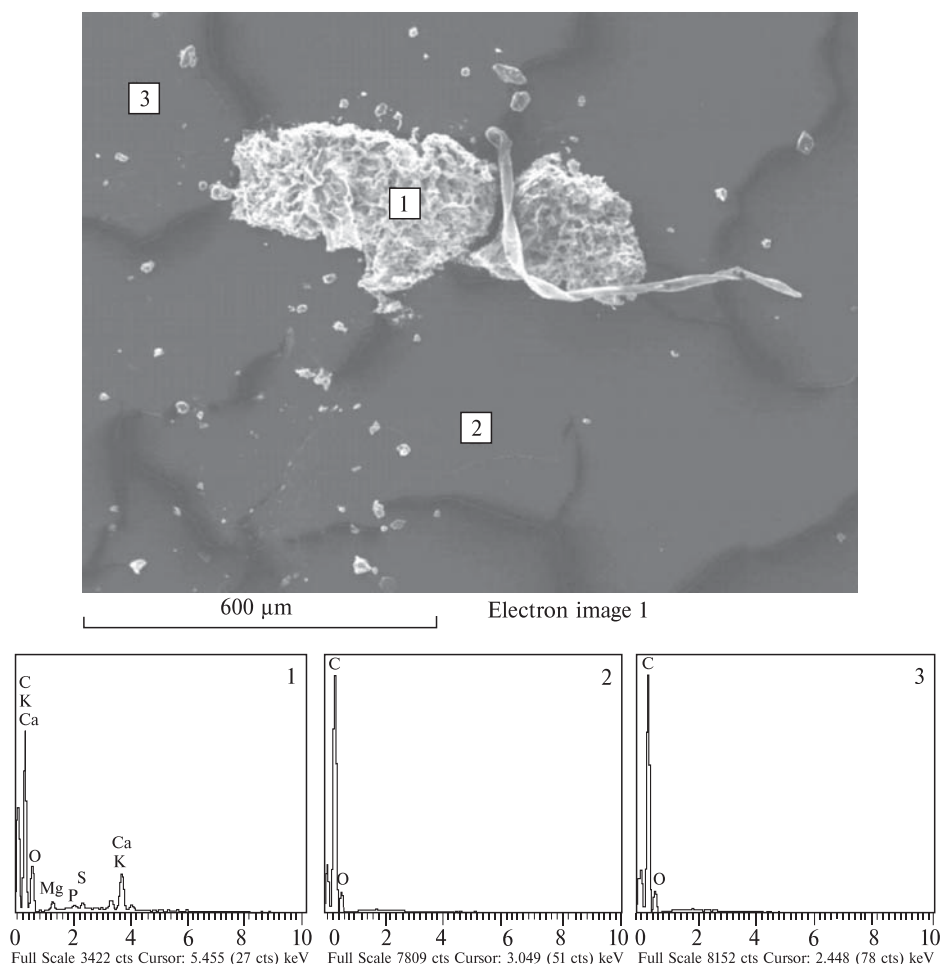
Исследования содержания элементов питания в глобоидах клеток эндосперма пшеницы методом EDRS показали различие в локализации элементов питания в частях зерновки. Наибольшее содержание калия в сочетании с фосфором обнаружилось в тканях зародыша. Полученная информация имеет практическую ценность для понимания процессов роста и развития проростков [8].

При использовании метода EDRS в исследованиях адгезии бактерии *Xylella fastidiosa*, вызывающей пятнистый хлороз citrusовых, обнаружены следы серы, кальция и магния в местах взаимодействия патогена и растения, что позволило сделать вывод о влиянии фермента метионилсульфоксидредуктазы в сочетании с тиольными группами в составе клеток растения на повышение адгезии патогена к растению [9].

В исследованиях накопления кальция в инфицированных изолятом SR99-UA ржавчины пшеницы флаговых листьях использовался анализ восприимчивого сорта яровой пшеницы Тэтчер и изогенной линии пшеницы с включенным геном Yr-18, обуславливающим устойчивость зрелых растений к поражению ржавчиной. Исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе Jeol JSM 6301 и спектрометре Bruker AM-300. Результаты показали, что в листьях линии с геном Yr-18 кристаллы кальция накапливаются в большем количестве, чем в листьях восприимчивого сорта. Кроме этого получены данные о связи роста накопления кальция со временем, прошедшим с начала заражения [10].

Метод EDRS также применяли для обнаружения распределения химических элементов в листьях *Pereskia bleo* и *Goniothalamus umbrosus* для последующего определения корреляционной зависимости между содержанием элементов в тканях растений и антимикробной активностью вытяжки, полученной из листьев этих растений. В результате установлена положительная корреляционная зависимость между повышенным содержанием углерода и кислорода и высокими антимикробными свойствами экстрактов листьев [11].

В условиях Западной Сибири в агроценозах кормовых культур распространен целый комплекс возбудителей болезней различной этиологии, приводящий к значительным потерям урожая [12–14]. Однако этиология и патогенез различных заболеваний изучены недостаточно. В связи с этим разработка инструментальных средств для определения зараженности растения на ранних стадиях патологического процесса является актуальной задачей.



Микрофотография участка пораженной ткани листа и содержание химических элементов в пробах

Цель исследования – изучить возможность применения метода EDRS для определения количественных и качественных различий в составе клеток больных и здоровых растений кормовых культур.

Работу проводили в Сибирском научно-исследовательском институте кормов, где метод EDRS применен для изучения образцов тканей растений кормовых культур, пораженных грибными и бактериальными болезнями. Образцы пораженных тканей отбирали из гербарного материала, заготовленного в период вегетации растений. Подготовленные образцы пораженных тканей растений исследовали на сканирующем электронном микроскопе с энергодисперсионным спектрометром и пакетом прикладного программного обеспечения INCAEnergy. Результаты проведенных исследований, основанные на анализе содержания химических элементов в образце пораженной ткани, представлены на рисунке.

При анализе рентгеновского спектра из разных проб образца выявлено повышенное содержание калия в месте скопления гиф фитопатогена (проба № 1) в сочетании с отсутствием спектра излучения калия в пробах, взятых из незараженных участков (пробы № 2 и 3), что может стать подтверждением роли калия как фактора пассивного иммунитета, а также подтверждает данные, полученные зарубежными исследователями.

Таким образом, проведенные предварительные эксперименты позволили сделать вывод об эффективности метода рентгеновского микроанализа в определении зараженности растений на ранних стадиях патологического процесса.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Ашмарина Л.Ф.** Совершенствование защиты зерновых культур от болезней и вредителей в Западной Сибири: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. – Новосибирск, 2005. – 42 с.
2. **Contreras-Medina L.M.** Smart Sensor for Real-Time Quantification of Common Symptoms Present in Unhealthy Plants // *Sensors*. – 2012. – N 12. – P. 784–805.
3. **Reed S.J. B.** Electron Microprobe Analysis // Cambridge University Press, 1997. – 326 p.
4. **Goldstein J., Newbury D.E., Joy D.C. et al.** Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: Third Edition // Springer US. – 2003. – 689 p.
5. **Thangarajan S., Paramasivam R., Chinthamony A.R. et al.** Starlin Element And Functional Group Analysis of *Ichnocarpus frutescens* R.Br. (Apocynaceae) // *International J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 4. – Suppl 5. – P. 343–345.
6. **Kaur K., Deep K., Bansal M. et al.** Peak energy shift with fertilization in mint plants: EDXRF measurements with synchrotron photon source. – *Applied Science Research*. – 2012. – Vol. 4 (5). – P. 2152–2160.
7. **Miah M., Wang M., Chino M.** Energy dispersive X-ray fluorescence for rapid potassium, calcium, and chloride diagnosis in barley // *J. of plant nutrition*. – 1999. – Vol. 2 (2). – P. 229–235.
8. **Lott J.N., Spitzer E.** X-ray Analysis Studies of Elements Stored in Protein Body Globoid Crystals of Triticum Grains // *Plant Physiology*. – 1980. – Vol. 66 (3). – P. 4940–4990.
9. **Leite B., Ishida M.L., Alves E. et al.** Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa* // *Brasilian J. of Medical and Biological Research*. – 2002. – Vol. 35. – P. 645–650.
10. **Elahinia S.A., Tewari J.P.** X-Ray Microanalysis of Calcium Signal Transduction as a Defense Response in Spring Wheat to the Stripe Rust Disease Caused by *Puccinia striiformis* f. sp. Triticum // *J. Agric. Sci. Technol.* – 2004. – Vol. 6. – P. 139–145.
11. **Siddig I.A., Nooraini M.A., Ahmad B.A. et al.** Abbdewahab Energy-dispersive X-ray microanalysis of elements' content and antimicrobial properties of *Pereskia bleo* and *Goniotalamus umbrosus* // *African J. of Biotechnology*. – 2009. – Vol. 8. – P. 2375–2378.
12. **Ашмарина Л.Ф., Горобей Н.М., Коняева Н.М., Агаркова З.В.** Атлас болезней кормовых культур в Западной Сибири. – Новосибирск, 2010. – 180 с.

13. Ашмарина Л.Ф., И.М. Горобей, Давыдова Н.В. Фузариозы кормовых бобов в Сибири // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2008. – № 7. – С. 42–46.
14. Горобей И.М., Ашмарина Л.Ф. Видовой состав и динамика болезней ячменя в лесостепи Западной Сибири // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 1997. – № 3-4. – С. 61.

Поступила в редакцию 29.09.2014

**A.S. KOROBEYNIKOV, Researcher,
L.F. ASHMARINA, Doctor of Science in Agriculture, Sector Head**

*Siberian Research Institute of Fodder Crops
e-mail: alf8@yandex.ru*

THE USE OF ENERGY-DISPERSIVE X-RAY SPECTROSCOPY IN PLANT PROTECTION

Material is given from a review of foreign literature data on using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDRS) in plant protection. Currently, the main method for accounting for the degree of infestation by plant pathogens is that of visual determination based on visual assessment of infection symptoms on different scales. It is shown that for early detection of pathogens and evidence of involvement in the pathogenesis is possible to use different variations of the EDRS. The preliminary studies carried out at the Siberian Research Institute of Fodder Crops with the use of this method have confirmed this possibility. It is shown that herbarium specimens of affected plants can be used in research for comparison with healthy ones. Quantitative and qualitative differences have been revealed in the composition of elements: thus, the potassium content in affected tissues is significantly higher than that in healthy plants.

Keywords: plant protection, phytopathogen, fodder crops, energy-dispersive X-ray spectroscopy, infestation.
