

УДК 550.4.574

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ОЦЕНКЕ ЭКОЛОГО- БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АГРОФИТОЦЕНОЗОВ¹

© 2006 Н.В. Прохорова, Ю.В. Макарова²

Изучена возможность использования гистохимического дитизонового метода для оценки суммарного накопления и распределения тяжелых металлов в органах и тканях сельскохозяйственных растений в условиях полевого эксперимента.

Введение

В последнее время в связи с проблемой загрязнения окружающей природной среды продуктами техногенеза объектом пристального внимания экологического мониторинга стали тяжелые металлы. Однако оценка их поступления и накопления в компонентах экосистем в преобладающем большинстве случаев ведется на основе аналитических методов, а полученная количественная информация не раскрывает, каким образом тяжелые металлы попадают в растения и распределяются внутри их органов и тканей. Важным подспорьем в разрешении этого вопроса являются гистохимические методы, в частности дитизоновая методика, предложенная И.В. Серегиним и В.Б. Ивановым [10] и успешно применяемая ими и некоторыми другими авторами [1-4] в собственных лабораторных исследованиях растений. Полученные в ходе модельных экспериментов результаты очень важны для понимания механизмов поступления и распределения металлов в растительных организмах. Вместе с тем исследования самарских ученых показали, что использование данной методики при изучении натурального растительного материала позволяет решать задачи экологического мониторинга антропогенно преобразованных территорий [8,9]. Работы, в которых дитизоновая методика использовалась бы для изучения распределения металлов в органах растений из агрофитоценозов, пока не известны.

¹ Представлена доктором биологических наук профессором Н.М. Матвеевым.

² Прохорова Наталья Владимировна, Макарова Юлия Владимировна (ecology@ssu.samara.ru), кафедра экологии, ботаники и охраны природы Самарского государственного университета, 443011, Россия, Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Условия и методы исследований

В качестве материала для исследований нами была выбрана широко используемая в сельскохозяйственной практике Самарской области культура – подсолнечник обыкновенный, сбор которого проходил на полях центральной части Волжского района Самарской области три раза за вегетационный период – в начале (с 27 мая по 3 июня), середине (с 7 по 10 июля) и на заключительном этапе (с 7 по 10 августа) онтогенеза. Доставленные в лабораторию живые экземпляры растений сразу же были изучены на предмет накопления и распределения металлов. С целью разрешения этого вопроса безопасной бритвой изготавливали серии поперечных срезов базальной области стебля, наиболее приближенной к основанию главного корня, зоны его ветвления и базального участка боковых корней, отходящих от главного корня в этой области.

Основное действующее вещество используемого в работе реактива – дитизон (дифенилтиокарбазон) – представляет собой черно-фиолетовые кристаллы, растворимые во многих органических растворителях и образующие в присутствии металлов (Fe, Zn, Cu, Pb, Cd, Ni, Cr, Co и др.) окрашенные в оттенки красного разной насыщенности, не растворимые в нейтральных и кислых водных растворах соли – дитизонаты [7].

Реактив готовили согласно прописи И.В. Серегина и В.Б. Иванова [10] непосредственно перед использованием, так как он не хранится. Обработанные реактивом срезы просматривали под бинокулярным микроскопом при сменном увеличении до 400 раз. Локализацию металлов определяли по характерному окрашиванию и оценивали по пятибалльной системе.

Оговоримся, что степень насыщенности окраски срезов, ее особенности, а следовательно, и суммарное количественное содержание металлов в органах и тканях есть визуальное проявление действия многих факторов, не только внешних (в первую очередь физико-химических характеристик субстрата и содержащихся в нем ионов), влияние которых на растительный организм весьма специфично в каждой конкретной точке отбора материала, но и внутренних, таких как эколого-биологические особенности вида и его анатомическое строение на определенном онтогенетическом этапе.

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных данных показал, что количественное содержание металлов в корневой системе и стебле у подсолнечника на протяжении вегетационного периода меняется (рис. 1). В частности, мы можем говорить об увеличении накопления контролируемых веществ тканями главного и боковых корней на заключительном этапе вегетации по сравнению с начальным периодом роста и развития растения, при этом разница между уровнями металлов у указанных типов корней в середине и конце онтогенеза предельно мала.

Главный корень подсолнечника характеризуется большей аккумулирующей активностью, чем боковые корни (рис. 1). Сказанное справедливо лишь для среднего и заключительного этапов вегетации, так как отсутствие данных по боковым корням у изучаемой культуры в начале онтогенеза (в силу слабой их развитости) делает невозможным проведение сравнительного анализа по накоплению тяжелых металлов корнями разных морфологических типов именно на этом временном отрезке наблюдения. Отмеченное расхождение в количественном содержании металлов в названных органах может быть обусловлено целым рядом причин [5,6,11,12], но все же, на наш взгляд, преобладание контролируемых ионов в анализируемом участке главного корня достигается в основном за счет их вертикального транспорта из нижележащих, еще не подвергшихся полному одревеснению областей корня, поглотительной деятельности боковых корней, а также вследствие интенсификации метаболизма тканей, расположенных в главном корне поблизости от места заложения и выхода боковых корней из тела главного корня.

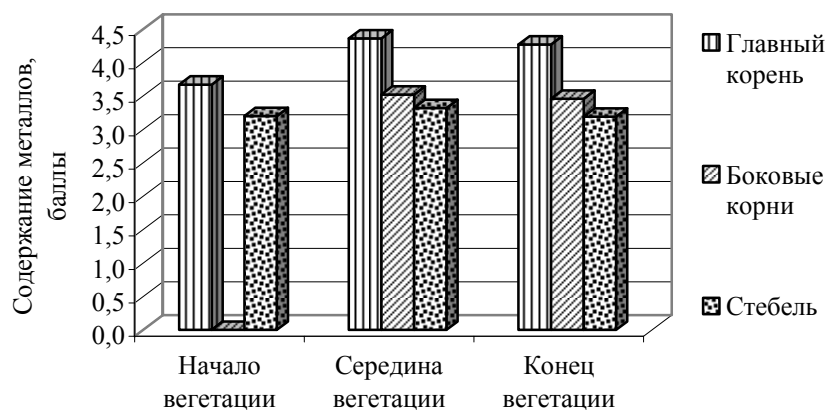


Рис. 1. Содержание металлов в стебле и корневой системе подсолнечника в разные периоды вегетативного развития

В отличие от корневой системы, содержание металлов в базальной части стебля подсолнечника снижается от начала к концу вегетации, а слабо выраженный пик аккумуляции изучаемых веществ приходится на середину лета, когда рост и развитие растений протекают наиболее интенсивно (рис. 1).

Проведенные исследования показывают, что наибольшим содержанием тяжелых металлов характеризуются сохранившиеся в ходе активно протекающей редукции на начальном этапе онтогенеза участки первичной коры, перидерма и подстилающая ее паренхимная зона, первичная ксилема (с момента начала наблюдений и до конца вегетативного развития), камбий (в середине и конце вегетации) в структуре главного корня и, кроме того, перидерма и камбий (в середине и конце лета) в структуре боковых корней подсолнечника. Наименьший уровень определяемых веществ присущ лучевым камбиальным производным (в на-

чале вегетации у главного корня и середине вегетации у боковых корней) и вторичной ксилеме (у главного корня в середине и конце вегетативного развития и у боковых корней в конце лета) (рис. 2).

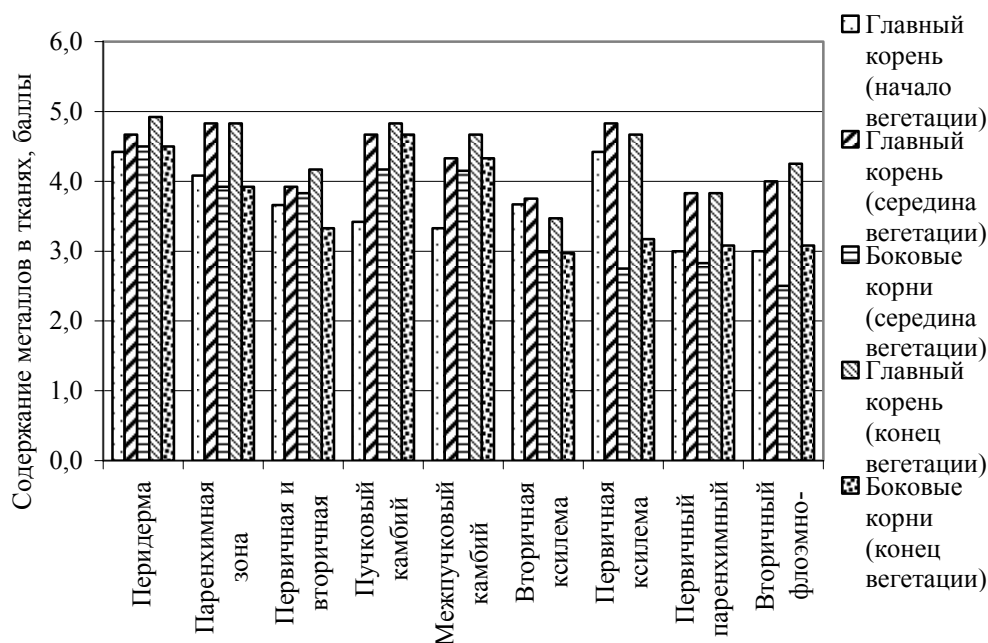


Рис. 2. Динамика содержания металлов в главном и боковых корнях подсолнечника на протяжении вегетации

Вполне очевидно, что преимущественное связывание металлов с перидермой обусловлено ее поверхностным, в силу утраты первичной коры, положением в органе. И если на начальном этапе развития подсолнечника высокое содержание металлов в перидерме складывается за счет их накопления как в клеточных оболочках, так и в протопластах, то на более позднем этапе вклад феллемы перидермы, в отличие от феллогена и феллодермы, в общее содержание анализируемых веществ сокращается и выражается лишь посредством концентрирования металлов в структуре клеточных оболочек, так как процесс одревеснения последних приводит к отмиранию внутриклеточного содержимого абсолютного большинства ее клеток.

Уровень аккумуляции контролируемых ионов в перидерме главного корня, в отличие от боковых корней, к концу лета возрастает (рис. 2), хотя такое свойство ткани, как практически полная непроницаемость для тока веществ извне, позволяет ожидать обратного. Отмеченная динамика, по нашему мнению, обусловлена двумя составляющими: поступлением металлов из надземных органов по расположенной в непосредственной близости от перидермы флоэме и их транспортом из нижележащих областей корня, степень одревеснения структур которых значительно ниже. Сохранение запаса металлов в перидерме боковых корней на одном и том же уровне в середине и конце вегетации при прогресси-

ровании процесса одревеснения вызвано перераспределением питательных веществ, являющимся залогом оптимальной деятельности всей корневой системы.

Высокая интенсивность поглощения металлов камбием (рис. 2) у обоих типов корней подсолнечника в середине и конце лета связана с активно протекающим в растении в целом и в корневой системе в частности вторичным утолщением, выражающимся посредством формирования и активного роста вторичных проводящих тканей. При этом необходимо отметить, что поглотительная активность пучкового камбия (независимо от момента наблюдения) выше, чем камбия межпучкового, что, очевидно, связано с ролью указанных анатомических образований в процессе вторичного утолщения.

Аккумуляция тяжелых металлов в проводящих тканях корней неоднозначна (рис. 2). Анализируя распределение исследуемых веществ в ксилеме, можно говорить о преобладании их накопления в первичных структурах ткани. Исключение составляют боковые корни в середине вегетативного развития, у которых количество металлов в первичной ксилеме меньше, чем во вторичной. Среди основных причин подобного распределения ионов металлов в главном корне и боковых корнях на заключительном этапе развития можно назвать барьерные свойства перидермы, которая препятствует радиальному транспорту веществ в ткани, в том числе и во вторичную ксилему, извне. Следовательно, пул металлов в ксилеме создается лишь за счет их поступления из нижележащих участков корня с поправкой на площадь, занимаемую первичной и вторичной ксилемой на поперечном сечении органа. Косвенным подтверждением роли перидермы в создании описанного выше распределения является и тот факт, что вторичную ксилему у главного корня в начале онтогенеза и у боковых корней в середине вегетации, в отличие от остальных случаев, нельзя считать тканью наименьшего накопления ионов металлов в силу незавершенности процесса одревеснения феллемы в перидерме. Необходимо уточнить, что насыщенность окраски и, следовательно, количество анализируемых веществ в структуре вторичной ксилемы убывают в направлении камбиального кольца и, как правило, вновь слабо возрастают в непосредственной его близости. Значительным содержанием металлов характеризуются стенки сосудов ксилемы и примыкающие к ним сопровождающие клетки. Из-за достаточно крупного размера содержание металлов в просветах сосудов вторичной ксилемы, в отличие от первичной ксилемы, невелико.

Характеризуя накопление контролируемых веществ во флоэме, можно говорить о последовательном увеличении их содержания от начала к концу вегетации у главного корня и о снижении такового у боковых корней (рис. 2). В сравнительном аспекте вторичная ксилема, кроме главного корня на начальном этапе развития, уступает флоэме по уровню аккумуляции металлов. То же можно сказать и о первичной ксилеме боковых корней, хотя разница между показателями, полученными для названных проводящих тканей у боковых корней в конце вегетации, мала. А значит, ксилема накапливает большее количество металлов лишь в главном корне в начале вегетативного развития. В середине и конце

вегетации распределение исследуемых веществ между проводящими тканями главного корня носит следующий характер (по убывающей): первичная ксилема > флоэма > вторичная ксилема. И только у боковых корней содержание металлов во флоэме однозначно больше, чем в ксилеме.

В стебле подсолнечника металлы ассоциированы по преимуществу с эпидермой (на всех этапах вегетативного развития), колленхимой (в начале и середине вегетации), пучковым камбием (в середине лета) и первичной ксилемой (в середине и конце вегетации) (рис. 3).

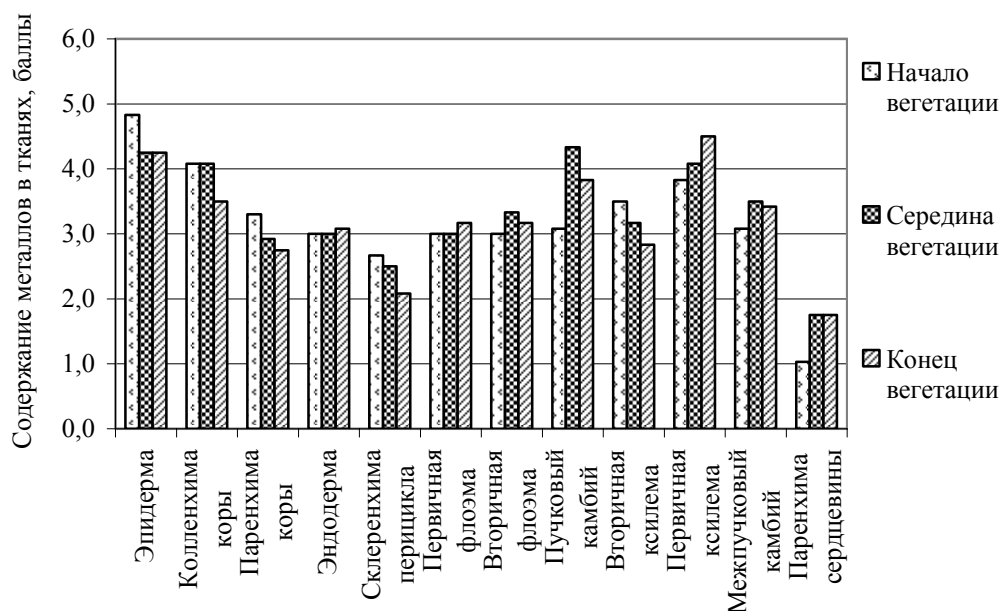


Рис. 3. Динамика содержания металлов в стебле подсолнечника на протяжении вегетации

Выступая в качестве одной из тканей, характеризующихся приоритетным связыванием тяжелых металлов, поглотительная активность эпидермы не остается неизменной на протяжении роста подсолнечника. Являясь максимальной в начальный период жизни растения вследствие высокого метаболизма эпидермальных клеток и слабо развитого кутикулярного слоя, она падает в середине лета, продолжая оставаться на том же самом уровне и на заключительном этапе онтогенеза.

Снижение к концу лета количества металлов в механических тканях стебля и в сопряженной с колленхимой паренхиме коры вызвано одревеснением структур склеренхимы и колленхимы (рис. 3).

На рис. 3 видно, что за исключением начального периода развития клетки пучкового камбия аккумулируют ионы металлов в большей степени, чем камбия межпучкового, а высокая активность пучкового камбия в середине вегетативно-

го развития связана с интенсивно происходящим процессом вторичного утолщения этого органа.

Сравнивая содержание металлов в различающихся по времени заложения составляющих ксилемы, мы можем говорить о количественном их преобладании в первичной ксилеме на всем протяжении жизни растения (рис. 3). Снижение количества анализируемых веществ в структуре вторичной ксилемы обусловлено не только ранее указанными процессами, происходящими в корневой системе, но и собственно вымыванием металлов в ходе приготовления временных препаратов стебля. За исключением середины вегетации, которой свойствен сходный уровень накопления металлов в структурах первичной и вторичной флоэмы, вторичные элементы данной проводящей ткани характеризуются более высокой поглотительной активностью, чем первичные. Интенсивность накопления интересующих нас веществ в первичной флоэме возрастает к концу вегетации, в то время как для вторичной флоэмы максимальное содержание металлов обнаруживается в середине лета. Суммарное количество металлов во вторичной флоэме на заключительном этапе вегетации все же больше, чем на начальном. Следовательно, распределение тяжелых металлов в проводящих тканях стебля в начале и конце онтогенеза полностью совпадает с их распределением в главном корне на тех же временных отрезках наблюдения. В середине вегетации по уровню аккумуляции металлов проводящие ткани анализируемого органа располагаются в следующий ряд (в порядке убывания): первичная ксилема > вторичная флоэма > вторичная ксилема > первичная флоэма.

На всем протяжении жизни растения минимальным содержанием интересующих нас веществ характеризуется сердцевинная паренхима стебля (рис. 3). Возрастая к середине лета, содержание металлов в клетках этой ткани продолжает сохраняться на том же самом уровне и в августе, так как основная масса клеток сердцевинной паренхимы у зрелого растения отмирает.

Заключение

Таким образом, предложенный И.В. Серегиним и В.Б. Ивановым [10] и используемый нами в исследовательской работе гистохимический метод с применением дифенилтиокарбазона, построенный на качественных цветных реакциях агента с ионами многих тяжелых металлов, показывает себя весьма удачно не только в модельном эксперименте, где контролируемым металлам искусственно отводится роль ведущего фактора, а действие остальных факторов предельно сбалансировано, но, что особенно важно, в натурных исследованиях – в условиях агрофитоценоза. Данный метод характеризуется экспрессностью, информативностью, не требует особых материальных и физических затрат, дает возможность в сочетании с количественными аналитическими данными о содержании тяжелых металлов в почве и растениях оценить диапазон накопления и характер распределения внутри органов, тканей и клеток либо отдельно взятого металла (в лабораторном эксперименте), либо их совокупности (в природной среде), а

значит, в конечном итоге, он может быть рекомендован для использования в экологическом мониторинге состояния окружающей среды с целью оценки полиметаллического загрязнения сельскохозяйственной продукции.

Литература

- [1] Аксютин, Ю.В. Гистохимическое изучение распределение кадмия, цинка и меди в тканях и вегетативных органах некоторых сельскохозяйственных растений / Ю.В. Аксютин // Биология – наука XXI века: тез. докл. 6-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых. Т. 2. – Тула: Изд-во Тул. гос. пед. ун-та им Л.Н. Толстого, 2002. – С. 6-7.
- [2] Башмаков, Д.И. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Д.И. Башмаков – Н. Новгород, 2002. – 19 с.
- [3] Башмаков, Д.И. Поглощение и транслокация тяжелых металлов в проростках огурца / Д.И. Башмаков, А.С. Лукаткин // Экологическая ботаника: наука, образование, прикладные аспекты: тез. докл. междунар. конф. – Сыктывкар: Изд-во Сыктывкарского ун-та, 2002. – С.33-34.
- [4] Кожевникова, А.Д. Распределение никеля, кадмия, свинца и стронция в прорастающих зерновках кукурузы / А.Д. Кожевникова // Матер. VIII молодеж. конф. ботаников. – СПб.: СПГУТД, 2004. – С. 127-128.
- [5] Колосов, И.И. Поглощительная деятельность корневых систем растений. / И.И. Колосов. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. – 338 с.
- [6] Нестерова, А.Н. Действие тяжелых металлов на корни растений. 1. Поступление свинца, кадмия, цинка в корни, локализация металлов и механизмы устойчивости растений / А.Н. Нестерова // Биол. науки. – 1989. – №9. – С. 72-86.
- [7] Перин, Д. Органические аналитические реагенты. / Д. Перин. – М.: Мир, 1967. – 407с.
- [8] Прохорова, Н.В. Гистохимические методы в экологическом мониторинге / Н.В. Прохорова, Ю.А. Аксютин // Региональный экологический мониторинг в целях управления биологическими ресурсами. – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. – С. 181-186.
- [9] Перспективы использования гистохимических методов в биогеохимии тяжелых металлов / Н.В. Прохорова [и др.] // Современные методы эколого-геохимической оценки состояния и изменений окружающей среды: докл. междунар. школы. – Новороссийск, 2003. – С. 217-223.
- [10] Серегин, И.В. Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях / И.В. Серегин, В.Б. Иванов // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44. – №6. – С. 915-921.
- [11] Сытник, К.М. Физиология корня / К.М. Сытник, М.Н. Книга, Л.И. Мусатенко. – Киев: Наукова думка, 1972. – 356 с.

- [12] Трапезников, В.К. Локальное питание растений / В.К. Трапезников, И.И. Иванов, Н.Г. Тальвинская. – Уфа: Гилем, 1999. – 260 с.

Поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 4/X/2006.

HISTOCHEMICAL ANALYSIS IN ESTIMATING ECOBIOGEOCHEMICAL PARAMETERS OF AGROPHYTOCENOSES³

© 2006 N.V. Prokhorova, Ju.V. Mackarova⁴

In the paper a possibility of application of histochemical ditizone method to estimating heavy metals total accumulation and dispersion in organs and tissues of some crops in field experiment conditions is analyzed.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 4/X/2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. N.M. Matveyev.

⁴ Prokhorova Natalia Vladimirovna, Mackarova Julia Vladimirovna (ecology@ssu.samara.ru), Dept. of Ecology, Botany and Environmental Protection, Samara State University, Samara, 443011, Russia.