

УДК 633.521:581.192.1

ВОЗДЕЙСТВИЕ КАДМИЯ НА МЕЗО- И УЛЬТРАСТРУКТУРУ СТЕБЛЯ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM*)

Е. Д. ГОНЧАРУК, Е. Н. БАРАНОВА, Г. А. ДУБРАВИНА,
Е. А. КАЛАШНИКОВА, Н. В. ЗАГОСКИНА

(Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии)

Изучали изменения структурного строения периферической части стебля, вызванные присутствием кадмия в почве. Использовали методы световой и электронной микроскопии. Мезоструктурный анализ позволил выявить влияние кадмия на процесс формирования лубяных пучков стебля льна-долгунца. Установлено также, что присутствие кадмия вызывает увеличение лигнификации клеток элементарных волокон лубяных пучков.

В последние годы возрос интерес к изучению поведения кадмия в растительном организме в связи с повышением поступления его в окружающую среду вследствие техногенного загрязнения почв, природных вод и атмосферы [1, 3].

Лен — культура, которая имеет высокие видовые адаптивные свойства и способна произрастать в разнообразных географических и почвенно-климатических условиях [4]. Почвы основных районов возделывания льна-долгунца (Нечерноземная зона России, Белоруссия)

подвержены воздействию тяжелых металлов, в том числе и кадмия. Присутствие кадмия в почвах может приводить к ухудшению качества получаемой конечной продукции. В связи с этим в настоящее время, помимо селекции льна на качество (тонковолокнистость, структурный состав волокнистой части, состав масла), устойчивость к полеганию и комплексу болезней, семенную продуктивность и дружность созревания растений, важно вести селекцию на экологическую устойчивость. При этом особое значение имеет изуче-

ние микроструктуры стеблей льна с целью определения влияния кадмия на образование лубяных пучков. Работ по изучению влияния этого металла на анатомическое строение стебля льна не проводилось.

Селекция на устойчивость к повышенному содержанию кадмия в почвенном растворе, проводимая на ранних этапах, сопровождается определенными изменениями в росте и развитии растений. Поэтому важно установить, на какие анатомические структуры стебля льна следует обращать внимание при изучении воздействия стрессового фактора, а также при анализе селекционного материала. Целью данной работы было изучение воздействия кадмия на мезо- и ультраструктурное строение стебля льна.

Методика

Для проведения микроструктурного анализа стеблей льна, выращенных в стрессовых условиях, был заложен вегетационный опыт. Растения выращивали в пластиковых сосудах, вмещающих 5 кг воздушно-сухой дерново-подзолистой легко суглинистой почвы. В каждый сосуд высевали по 75 семян. Опыт проводили в 3-кратной повторности. Кадмий вносили в почву при набивке сосудов в виде нитрата кадмия по 15 мг/кг. Дан-

ная концентрация была выявлена в первых сериях экспериментов [2]. Использовали сорта Псковский 359, Спартак, Смоленский. Образцы отбирали из средней части стебля в онтогенетическую фазу быстрого роста. Анализировали строение лубяных пучков, расположенных по периферической части стебля. В каждом варианте отбирали пробы из 10 растений в 3-кратной повторности.

Световая микроскопия.

Полутонкие срезы получали на ультра микротоме LKB-3 при помощи стеклянного ножа. Срезы толщиной 1 мкм помещали в каплю дистиллированной воды на предметное стекло и подсушивали на термостатированном столике (60°C). Препараты окрашивали толлуидиновым синим в течение 10 мин во влажной камере на термостатированном столике и промывали дистиллированной водой для удаления лишней краски. Образцы анализировали и фотографировали при помощи микроскопа Opton (Германия). Рабочее увеличение x20, x40. Микроскопический анализ начинали с измерения поперечных размеров элементарных волокон с помощью окуляр-микрометра. В каждом варианте было проанализировано по 100 клеток на 1 срез. Всего изучено по 50 образцов в каждом варианте. Измерения

производили при увеличении объектива в 40 раз. После установления поперечного размера элементарных волокон определяли количество элементарных волокон, связанных одревесневшими срединными пластинками. Для этого на срез наносили каплю раствора флороглюцина и каплю концентрированной соляной кислоты. После обработки среза реактивами одревесневшие участки клеточной стенки окрашивались в розовый цвет.

Электронная микроскопия. В электронно-микроскопических исследованиях использовали формваровые и коллодиевые пленки-подложки. Образцы для фиксации брали из средней части стебля растения. Острой бритвой вырезали кусочки размером 1 мм, погружая фрагменты растения на охлажденный столик в 0,1 М фосфатном буфере, под лупой. Использовали по 2 мл рабочего раствора на образец. Материал обезживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации 30% (20 мин), 50% (20 мин), 70% (20 мин), 96% (20 мин), абсолютный этанол (20 мин); далее образцы помещали в окись пропилен.

Для контрастирования использовали 1% раствор уранилацетата, в котором выдерживали 40 мин при комнатной температуре, и цитрат

свинца (по Рейнольдсу) — 10 мин, также при комнатной температуре.

Анализ ультратонких срезов растительного материала производили на электронном микроскопе Н-300 фирмы «Hitachi» (Япония). При просмотре использовали увеличение $\times 700$, $\times 4000$ — $\times 20000$. Фотографирование объектов производили при $\times 700$, $\times 5000$, $\times 7000$, $\times 10000$.

Результаты

В ряде исследований [10, 11] отмечается, что количество и качество волокна в льняных стеблях зависит от диаметра стеблей и их структуры. Элементарные волокна на поперечном срезе в средней части стеблей обычно округло-многогранной формы. Содержание волокна напрямую зависит от размера лубяных пучков в радиальном направлении, количества элементарных волокон на срезе, площади, занятой лубяными пучками на срезе. Прядильная способность льняного волокна определяется формой лубяных пучков. Лубяные волокна являются основными структурными элементами, которые используются как сырье для текстильной промышленности. Строение лубяных пучков позволяет судить о качестве волокна, а также указывает на физиологическое состоя-

ние растения в различных условиях выращивания.

Лучшие сорта имеют лубяные пучки правильной удлиненно-овальной или тангентальной формы с ровными краями. По литературным данным, на поперечном срезе у льна выделяют 3 типа волокнистых пучков: компактных — с выраженными округлыми очертаниями, полиморфный — с изменяющимися неровными очертаниями пучков, тангентальный — с вытянутой формой пучков [6, 9]. В наших исследованиях мезоструктуры поперечный срез с лубяной части стебля сохранял свою характерную структуру как в контрольном, так и в опытном варианте у всех изучаемых генотипов: снаружи стебель покрыт кутикулярной пленкой, под которой расположен однослойный эпидермис, клетки которого имеют удлиненную форму в направлении оси стебля. Наружная стенка клеток эпидермиса утолщена.

Коровая (лубяная) паренхима — ткань, состоящая из клеток с тонкой целлюлозной оболочкой, которая примыкает к эпидермису. Коровая паренхима имеет рыхлое строение, внутри ее клеток содержатся хлоропласты. Лубяные пучки с наружной и боковых сторон окружены клетками эндодермы. Вторичная флоэма расположена к центру от лубяных пучков,

состоит из мелких паренхиматических клеток.

Древесина льяного стебля построена из сосудов, трахеид, либриформа и древесной паренхимы. На поперечных срезах элементы древесины однородны по размерам и расположены правильными радиальными рядами. Это объясняется их вторичным происхождением [6]. Почти вся древесина состоит из вторичной ксилемы. Первичная ксилема расположена к центру от вторичной, сливаясь с элементами этой структуры и одревесневшими клетками сердцевинной паренхимы. В центре стебля находится большая полость.

В связи с тем, что волокнистость растений льна-долгунца определяется развитием лубяных пучков и строением клеток элементарных волоконца, нами были проанализированы данные показатели в стрессовых и нормальных условиях.

При исследовании мезоструктуры поперечных срезов стеблей льна-долгунца всех сортов изучаемых вариантов на световом микроскопе клетки склеренхимы были различимы, имели толстые клеточные стенки. Более детальное рассмотрение клеток лубяных пучков показало, что при внесении кадмия в субстрат происходят изменения в анатомическом строении стебля льна-долгунца.

Так, у сорта Псковский 359 при воздействии металла изменился объем лубяного пучка, что выражалось в уменьшении числа клеток элементарных волоконцев и их размеров (от 12 до 30 мкм) в пределах одного пучка (рис. 1, *вверху*). При этом средние размеры клеток элементарных волоконцев составили 19,28 мкм при толщине клеточной стенки 6,61 мкм. Лубяные пучки имели нитевидную форму с расположением клеток элементарных волоконцев в 1-2 слоя. У растений контрольного варианта клетки элементарных волоконцев располагались в 2—4 слоя, плотно примыкая друг к другу. При этом размеры клеток элементарных волоконцев в пределах одного лубяного пучка практически не изменялись и составляли в среднем 20,55 мкм (что согласуется с литературными данными, по которым диаметр элементарных волоконцев в средней части стебля колеблется от 16 до 32 мкм) при средней толщине клеточной стенки элементарных волоконцев 6,16 мкм.

У сорта Смоленский воздействие кадмия также оказывало отрицательное влияние на структуру лубяных пучков (рис. 1, *в центре*). Это выражалось как в нарушении компактности расположения клеток элементарных волоконцев в лубяном пучке, так и в

появлении большого числа клеток, имеющих различные размеры в пределах одного лубяного пучка (от 17 до 28 мкм).

У сорта Спартак число клеток элементарных волоконцев в лубяном пучке было меньше, чем в контроле (рис. 1, *внизу*). Как и у предыдущих генотипов, это было связано с образованием лубяных пучков нитевидной формы по сравнению с 2-3-слойным расположением клеток элементарных волоконцев лубяного пучка в контроле. При внесении кадмия также прослеживалось рыхлое соединение клеток элементарных волоконцев в лубяном пучке по сравнению с их компактным 3-слойным распределением в контроле. При этом размеры клеток элементарных волоконцев контрольного и опытного вариантов составили в среднем 25,19 и 23,39 мкм при толщине клеточных стенок элементарных волоконцев соответственно 8,46 и 7,60 мкм.

Известно, что форма полости элементарных волоконцев на поперечном срезе соответствует форме самого элементарного волокна [6, 9]. В полости элементарных волоконцев наблюдаются остатки протоплазмы, что подтверждалось зеленым окрашиванием при проведении характерной реакции зеленого окрашивания. При воздействии

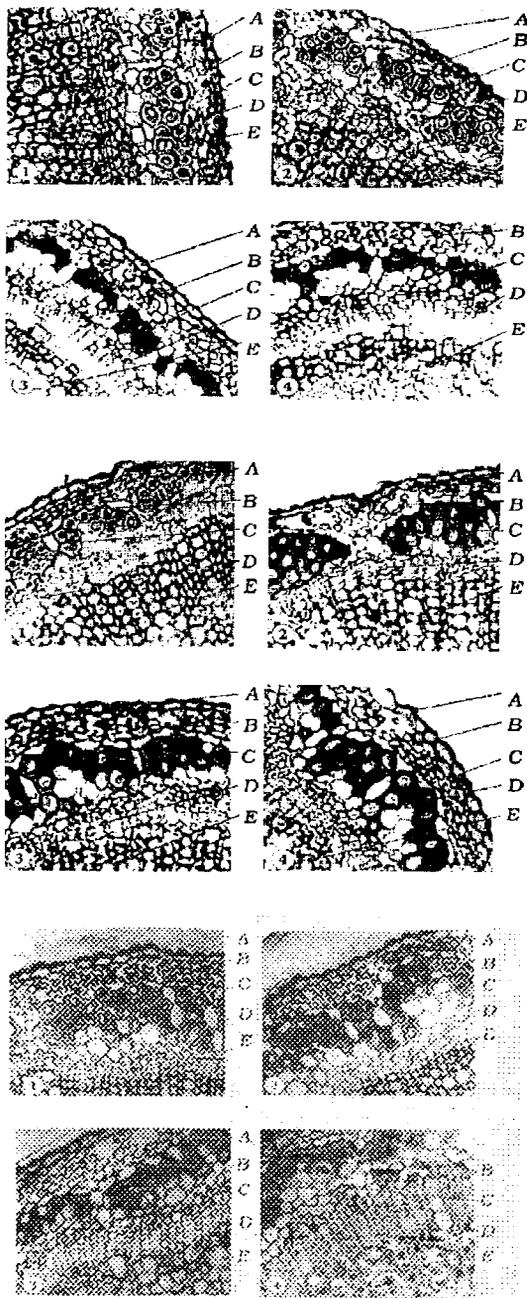


Рис. 1. Мезоструктура срединной части стебля льна-долгунца (*Linnit usitatissimum*) сортов Псковский-359 (вверху), Смоленский (в центре), Спартак (внизу) в фазе быстрого роста (x120).

1, 2 — образцы срезов контрольного варианта. 3, 4 — образцы срезов опытного варианта. А — однослойный эпидермис, В — коровая паренхима, С — клетки элементарных волоконцев лубяного пучка, D — флоэма, Е — ксилема.

кадмия у всех анализируемых генотипов полости внутри клеток элементарных волоконца иногда были крупные округлые, чаще — щелевидные или вытянутые, это указывает на то, что элементарные волокна имели вытянутую форму. В нормальных условиях элементарные волокна чаще имели точечную полость, что характерно для округло-многогранной формы.

Исследование мезоструктуры лубяных пучков растений льна-долгунца показало, что наличие кадмия в субстрате отрицательно влияет на их формирование, что выражалось в образовании пучков нитевидной формы толщиной в 1-2 клетки и как следствие в уменьшении числа клеток элементарных волоконца в лубяном пучке. Внесение кадмия приводило также к большей вариации поперечных размеров клеток элементарных волоконца в пределах одного пучка, что является косвенным показателем небольшой длины элементарных волокон, а следовательно, более низкого качества волокна. В опытных вариантах наблюдалось также рыхлое некомпактное расположение клеток элементарных волоконца в лубяном пучке.

У многих лубоволокнистых растений волокна пропитываются лигнином, одревесневают. Поскольку степень одре-

веснения волокна меняется у растений одного и того же вида в зависимости от условий выращивания, нами было проанализировано воздействие кадмия на интенсивность процесса лигнификации. При проведении характерной реакции окрашивания флороглюцином с соляной кислотой было установлено, что при внесении кадмия на поперечных срезах стебля наблюдалось розовое окрашивание большей части срединных пластинок клеток элементарных волоконца в лубяном пучке, т. е. это свидетельствовало о значительной степени одревеснения. В контрольных вариантах в пределах одного пучка розовое окрашивание проявлялось в области 1-2 срединных пластинок, что позволяет судить о низкой степени одревеснения волокна у растений, выращиваемых в нормальных условиях. По литературным данным, неблагоприятные условия выращивания вызывают структурные и химические изменения льняного стебля, что способствует отложению лигнина и делает волокно грубым, снижая его качество и затрудняя процессы обработки [7, 8]. Процент волокон, связанных одревеснением, находится в отрицательной корреляционной зависимости с качеством волокна [9]. Все эти факторы указывают на негативное воздействие кад-

мия на растения льна, выражающееся в увеличении степени лигнификации льняного волокна.

При исследовании ультраструктуры поперечных срезов лубяных волокон на электронном микроскопе при малом увеличении клеточная стенка обычно выглядит двухслойной (рис. 2): наружный слой (первичная оболочка) — гомогенный и очень тонкий (0,2-0,3 мкм), состоящий из срединной пластинки (А) и первичной оболочки (В); далее располагается вторичная оболочка (С), более толстый (до нескольких микрометров) слой, в котором может выявляться тончайшая

концентрическая ламеллированность. Это связано главным образом с различной плотностью отдельных частей целлюлозного матрикса или наличием прерывистости в целлюлозном матриксе. У лубяных волокон *Linum usitatissimum* к полости клетки прилежит узкий дополнительный слой с волнистым контуром, в котором выявляется заметная ламеллированность.

Толщина первичной оболочки у различных волокон одного и того же вида довольно близка, тогда как у вторичной оболочки она варьирует, как и ширина полости клетки, иногда составляющая менее 10% ее объема. Вторич-

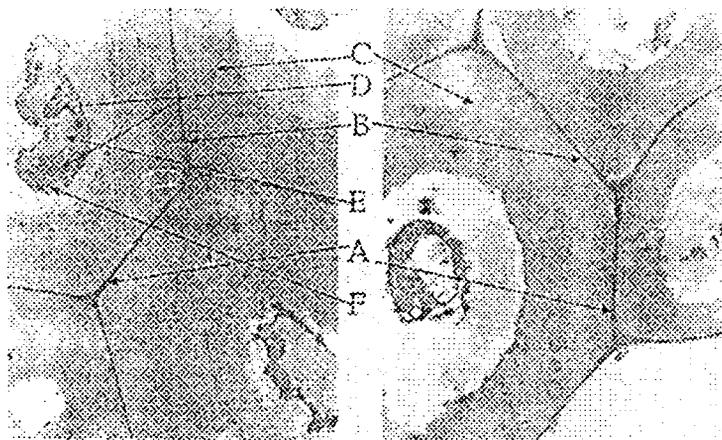


Рис. 2. Характерная ультраструктура клеток лубяного пучка стебля льна-долгунца в нормальных условиях (слева) и при воздействии кадмия (справа).

А — срединная пластинка, В — первичная клеточная стенка, С — вторичная клеточная стенка, D — пластиды, E — вакуоль, F — цитоплазма, G — сформированная клетка лубяного пучка.

ная оболочка клеток лубяного пучка представляет собой равномерно расположенные (под небольшим наклоном к оси клетки) микрофибриллы целлюлозы. Путем последовательного отложения микрофибрилл целлюлозы происходит утолщение вторичной оболочки, которая составляет основную толщину волокна.

При исследовании ультраструктуры клеток лубяных пучков *Linum usitatissimum* сортов Псковский 359, Смоленский, Спартак под влиянием кадмия значительных изменений различных слоев клеточной стенки, пластид, цитоплазмы и ядра не выявлено. Однако можно предположить, что наличие кадмия в субстрате оказывает негативное влияние на равномерность формирования клеток лубяного пучка и сроки образования вторичной клеточной стенки. Так, во всех опытных образцах наблюдались различия по толщине вторичной клеточной стенки в пределах одного лубяного пучка, причем часто встречались клетки неправильной формы или с различающимися размерами (см. рис. 1). Кроме этого, часто встречались клетки, у которых первичная и вторичная клеточные стенки не прилегали друг к другу, что также, возможно, связано с воздействием кадмия на клеточном уровне (см. рис. 2).

Выводы

1. На поперечном срезе стебля в вариантах с внесением кадмия клетки элементарных волокон отличаются большей вариабельностью поперечных размеров в пределах одного волокнистого пучка.

2. Присутствие кадмия в субстрате негативно влияет на формирование лубяных пучков, что выражается в уменьшении количества клеток элементарных волокон в пучке, формировании нитевидных лубяных пучков, некомпактном расположении клеток элементарных волокон в лубяном пучке, а также в неравномерности размеров клеток элементарных волокон в пределах одного пучка и в сроках формирования вторичной клеточной стенки. Изменений ультраструктуры различных слоев клеточной стенки, пластид, цитоплазмы и ядра не выявлено.

3. Присутствие кадмия в субстрате вызывает одревеснение срединных пластинок клеток элементарных волокон большей части лубяного пучка, в то время как в контрольном варианте лигнификации были подвержены всего 2-3 срединные пластинки всех клеток лубяного пучка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева-Попова Н. В. Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов.

Л.: ЛГУ, 1991. — 2. Гончарук Е. А., Калашикова Е. А. Изучение морфофизиологических реакций генотипов льна-долгунца в различных условиях выращивания при воздействии соли кадмия. — С.-х. биотехнология. М.: Воскресенье, 2000. — 3. Добровольский В. В. Тяжелые металлы в окружающей среде. МГУ, 1980. — 4. Жученко А. А. Лен в России и мировые тенденции его производства. — Сб. науч. тр. ВНИИЛ. Торжок, 1994, с. 5—19. — 5. Косицин А. В., Алексеева-Попова Н. В. Действие тяжелых металлов на растения и механизмы металлоустойчивости. — Растения в экстремальных условиях минерального питания. Л.: 1983, с. 5-22. — 6. Ордина Н. А. Структура лубоволокнистых растений и ее изменение в процессе переработки. М.: 1978. — 7. Сальников В. В., Агеева М. В.,

Юмашев В. Н., Лозовая В. В. Ультраструктурный анализ лубяных волокон. — Физиология растений, т. 40, № 3, 1992, с. 458-464. — 8. Серегин И. В., Иванов В. Б. Является ли барьерная функция эндодермы единственной причиной устойчивости ветвления корней к солям тяжелых металлов? — Физиология растений, т. 44, № 6, 1997, с. 922-925. — 9. Тихвинский С. Ф. Улучшение качества прядильного льна. Л.: Колос, 1978. — 10. Шеховцова О. С. Сравнительное анатомическое изучение *Linum usitatissimum* и *Linum angustifolium* HucLs. — Науч. техн. бюл. Всерос. ин-та растениеводства им. Н. И. Вавилова. Генофонд культурных растений для целей селекции, вып. 234, с. 30~31. — 11. Meharg A. A. *Physiol. Plant*, vol. 88, 1993, p. 191-198.

Статья поступила
12 февраля 2001 г.

SUMMARY

Samples of flax stem were taken after conducting experiment in the soil. Light and electronic microscopy was used to study the changes in fibre cells structure of flax (*Linum usitatissimum*) stems during the phase of rapid growth in cadmium presence. Microstructural analysis has shown the influence of cadmium on formation of fibre flax. An increase of lignification of fibre small bunch cells was found in stress conditions.