

Фізіологія рослин

УДК 582.32.54.06

ВПЛИВ ІОНІВ СВИНЦЮ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ МОХІВ

О. Баїк, О. Щербаченко

Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаника, 11, Львів 79000, Україна
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

Показано, що з підвищенням концентрації свинцю у середовищі до 100,0 мкМ знижується інтенсивність люмінесценції хлорофілу листків мохів *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. і *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp у 1,5–2,0 і 0,8–0,9 разу порівняно з контролем; індекс толерантності становив 60 і 48% відповідно. Електрофоретично виявлено послаблення інтенсивності фракцій естерази з ММ 29 і 45 кД у *A. serpens*, а в *D. aduncus*, крім цього, появу фракцій з 66 та 132 кД. Встановлено зв'язок між фотосинтетичними, ростовими та біохімічними змінами досліджуваних видів мохів під впливом свинцю.

Ключові слова: свинець, мохи, індекс толерантності, люмінесценція хлорофілу, множинні молекулярні форми естерази.

Проблема адаптації живих організмів до мінливих умов природного середовища набула особливої актуальності у зв'язку зі зростанням впливу техногенного забруднення різними хімічними речовинами, у тому числі важкими металами (ВМ). Адаптація рослин до токсичної дії поллютантів настає лише у вузькому діапазоні концентрацій і за певних умов природного середовища, коли природні фактори не створюють додаткових стресових ситуацій [6].

Токсична дія ВМ проявляється на активності ростових процесів та біохімічному рівні – це порушення інтенсивності фотосинтезу, стану та вмісту пігментів, біосинтезу білків і ферментів тощо [3, 4]. Вплив ВМ на морфофізіологічні показники квіткових рослин (ростові параметри, інтенсивність фотосинтезу, дихання, вміст пігментів і т.д.) вивчено досить вичерпно [9–12, 14]. Однак дія поллютантів на вищезгадані процеси у мохів ще недостатньо з'ясована. У зв'язку з цим досліджували фізіолого-біохімічні реакції мохів *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. і *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. на вплив нітрату свинцю.

У дослідженнях використовували лабораторні культури мохів *A. serpens* і *D. aduncus*, отримані шляхом вегетативного розмноження природних зразків з околиць м. Львова. Для дослідження регенераційної здатності мохів з листкостеблових пагонів (гаметофорів) відокремлювали листки і поміщали на агаризовані середовища Кноп II: дослідні – з 0,1–100,0 мкМ $Pb(NO_3)_2$, контрольні – без металу. Мохи вирощували в контрольованих умовах освітлення ($2,0 \pm 0,2$ тис. лк), температури (20°C) та 16-годинному світловому режимі. Через 14 днів аналізували регенерацію під бінокулярним мікроскопом „Jenaval” (12,5 \times) [5].

Регенераційну здатність зразків мохів порівнювали за методом Д. С. Вілкінса [21], обчислюючи індекс толерантності (It):

$$It = \frac{l_n}{l_k} \times 100\%$$

де l_n – кількість регенерантів гаметофорів на середовищі з металом; l_k – кількість регенерантів гаметофорів на середовищі без металу.

Дослідження впливу нітрату свинцю на інтенсивність люмінесценції хлорофілу листків мохів проводили на цитофлуориметрі [5]. Виміри проводили у клітинах між жилкою та обляміркою середньої частини листків. Результати досліджень кількісного аналізу й інтенсивності люмінесценції хлорофілу опрацьовували статистично [7].

Для електрофоретичного аналізу рослини розтирали в охолодженому до 4°C тригліциновому буфері (рН 8,3), додаючи захисні агенти (100 мг трилону Б, 400 мг аскорбінової кислоти на 8 мл буфера та 0,06 мл меркаптоетанолу; співвідношення рослинного матеріалу до буфера 1:1). Одержаний гомогенат центрифугували при 3 тис. об/хв. До супернатанту додавали 70%-ний розчин сахарози з розрахунку 0,2 мл розчину сахарози на 1 мл екстракту [19]. На поверхню гелю в електрофоретичних стовпчиках наносили витяжки об'ємом до 0,25 мл, які містили 50–250 мкг білка. Вміст білка визначали за методом О.А. Лоурі [17]. Для виявлення естерази застосовували інкубаційне середовище з 5-броміндоксилацетатом [18].

Гальмування ростових процесів мохів є одним із перших симптомів інтоксикації і призводить до зниження темпів репродукції [1]. Встановлено, що низькі концентрації нітрату свинцю (0,1 мкМ) стимулювали регенераційну здатність ізольованих листків у *A. serpens*, натомість вищі концентрації її пригнічували. У *D. aduncus* ростові процеси сповільнювалися залежно від вмісту металу в середовищі. Виявлено, що з підвищенням концентрації свинцю до 100,0 мкМ ІТ *A. serpens* становив 60%, а *D. aduncus* – 48% (рис. 1).

Аналіз індексу толерантності (*It*) вказує на різну токсикотолерантність мохів *A. serpens* і *D. aduncus*. Так, низькі концентрації свинцю (0,1 мкМ) стимулювали регенераційну здатність гаметофорів *A. serpens*. Хоча в обох випадках із підвищенням вмісту Pb^{2+} у середовищі спостерігалось зниження *It*. У літературі [4, 6, 11] описані зміни ростової активності (зменшення розмірів листків, затримка росту, переважання розвит-

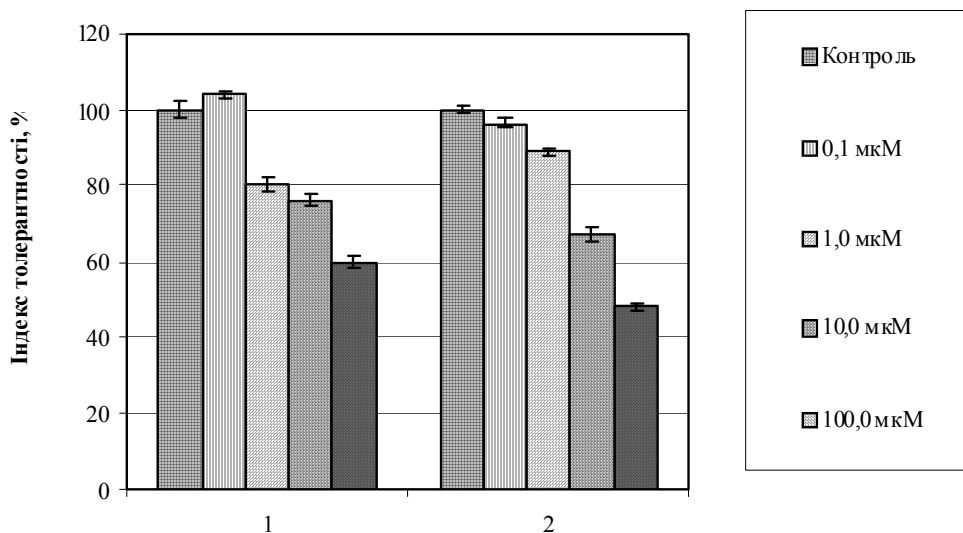


Рис. 1. Вплив різних концентрацій нітрату свинцю (0,1–100,0 мкМ) на індекси толерантності мохів: 1 – *A. serpens*, 2 – *D. aduncus*.

ку кореневої системи над надземною та ін.) під дією ВМ, унаслідок чого квіткові рослини набувають ознак, які сприяють їх виживанню у стресових умовах.

Одним із найчутливіших фізіологічних процесів до дії ВМ є фотосинтез. Відомо, що свинець спричинює зменшення інтенсивності фотосинтезу, зокрема, істотне зниження вмісту хлорофілу внаслідок пригнічення процесів біосинтезу пігменту [2, 15, 16, 20]. Свинець належить до групи високотоксичних ВМ. Токсичність металу зумовлена передусім здатністю міцно зв'язуватися в живих клітинах із азото- та сірковмісними реакційними центрами аміно- і сульфгідрильних груп ферментів. Аналіз стану хлорофілу, який визначали за інтенсивністю люмінесценції хлорофілу у листках досліджуваних видів мохів, показав, що низька концентрація Pb^{2+} (0,1 мкМ) спричинювала підвищення інтенсивності люмінесценції хлорофілу в *A. serpens* у 1,1, тоді як в *D. aduncus* простежувалася тенденція її поступового зниження. Отримані результати вказують на стимулюючий вплив низьких концентрацій металу у *A. serpens*. Подібний ефект спостерігали за дії низьких концентрацій кадмію (0,01 мкМ) у *Plagiomnium undulatum* Hedw. [8]. Із підвищенням концентрації свинцю у середовищі до 100,0 мкМ інтенсивність люмінесценції хлорофілу знижувалася як у моху *A. serpens* у 0,8–0,9 разу, так і в *D. aduncus* у 1,5–2,0 рази, порівняно з контролем (рис. 2). Отже, інгібує вплив сублетальної концентрації Pb^{2+} більшою мірою проявлявся у *D. aduncus*.

Зниження вмісту хлорофілів під впливом сублетальної концентрації нітрату свинцю може бути зумовлене рядом причин, одна з яких – інгібування активності деяких ферментів синтезу хлорофілу, зокрема, дегідратази γ -амінолевулінової кислоти і протохлорофілредуктази [13], а також посилення його деструкції, яка може відбуватися внаслідок прямої дії металу на пігментний комплекс або опосередковано – через активацію вільнорадикального окислення [6]. Встановлено, що найбільше пригнічення інтенсивності люмінесценції хлорофілу за дії сублетальної концентрації свинцю проявлялося у гігрофітного моху.

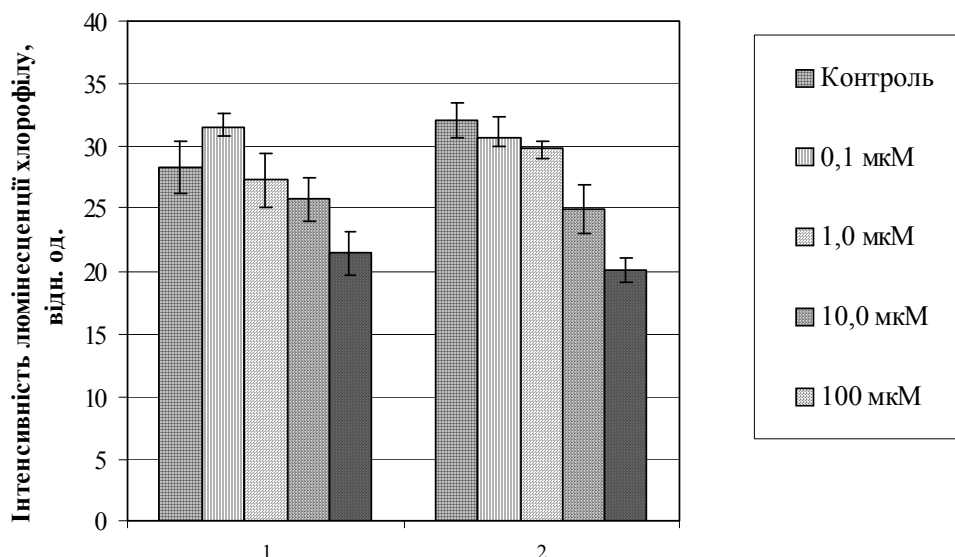


Рис. 2. Зміна інтенсивності люмінесценції хлорофілу листків мохів: 1 – *A. serpens*, 2 – *D. aduncus* під впливом різних концентрацій нітрату свинцю (0,1–100,0 мкМ).

Таким чином, підвищення стійкості ростових процесів у *A. serpens* до впливу Pb^{2+} супроводжувалося збільшенням стійкості пігментної системи у певному концентраційному діапазоні металу (0,1–1,0 мкМ). Таку закономірність деякі автори [10] вважають адаптивним пристосуванням фотосинтетичного апарату рослин до стресу. Як показали наші дослідження, особливості ростових і фотосинтетичних реакцій спричинені різною чутливістю проаналізованих мохів до токсичного впливу свинцю.

Електрофоретичний аналіз множинних молекулярних форм естерази у гаметофорах *A. serpens* і *D. aduncus* за дії різних концентрацій свинцю підтвердив наше припущення про різну токсикотолерантність досліджуваних мохів. Зокрема, встановлено, що під впливом 1,0–10,0 мкМ нітрату свинцю у *A. serpens* посилилася інтенсивність фракцій множинних молекулярних форм естерази з молекулярною масою (ММ) 45 та 66 кД. Істотною виявилася дія сублетальної концентрації свинцю (100,0 мкМ) – послабилася інтенсивність низькомолекулярних фракцій естерази з ММ 29 та 35 кД (рис. 3).

У *D. aduncus*, натомість, уже низькі концентрації свинцю спричинили істотніші зміни – послаблення низькомолекулярних (29–35 кД) та незначне посилення високомолекулярних фракцій естерази (132–272 кД). Підвищення концентрації свинцю у середовищі до 100,0 мкМ зумовило у *D. aduncus* не лише посилення інтенсивності високомолекулярних фракцій естерази з ММ 132–272 кД, але й появу фракції з ММ 66 кД, зникнення фракції з ММ 35 кД та послаблення інтенсивності фракції з ММ 29 кД (рис. 4).

На підставі проведених електрофоретичних аналізів множинних молекулярних форм естерази показано, що зміни в експресії генів корелювали з концентрацією металу у середовищі. У листкостеблових пагонах обох досліджуваних мохів під впливом сублетальної концентрації нітрату свинцю відбувалися суттєві зміни у спектрі множинних молекулярних форм естерази, особливо у моху *D. aduncus*.

Еволюційно мохи виробили адаптивний потенціал щодо екстремальних факторів довкілля і реалізують його за допомогою морфологічних, біохімічних і генетичних механізмів залежно від ступеня і тривалості дії чинника [1].

Зміни електрофоретичного спектру естерази під впливом свинцю в наших дослідженнях корелювали з порушенням нормальної життєдіяльності рослин. У мохів, як і в інших рослин, ВМ та інші стресові фактори спричиняють фізіологічні (зниження ростової активності й інтенсивності люмінесценції хлорофілу) та біохімічні зміни [2, 3]. Це може свідчити про ядерно-цитоплазматичний контроль основних метаболічних процесів у

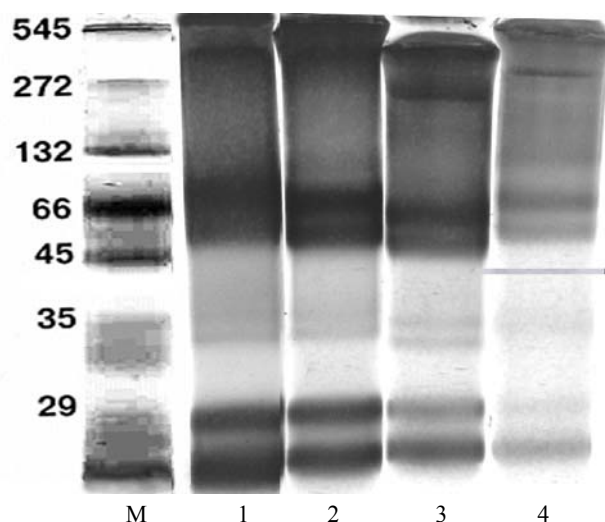


Рис. 3. Зміна електрофоретичного спектру множинних молекулярних форм естерази у моху *A. serpens* під впливом різних концентрацій нітрату свинцю: М – маркер; 1 – контроль; 2 – 1,0 мкМ; 3 – 10,0 мкМ; 4 – 100,0 мкМ.

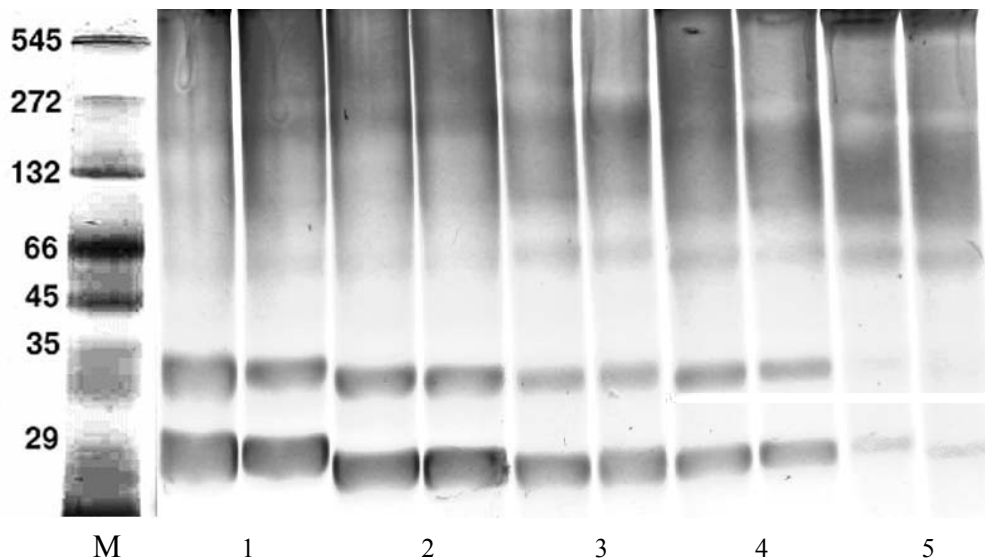


Рис. 4. Зміна електрофоретичного спектру множинних молекулярних форм естерази у моху *D. aduncus* під впливом різних концентрацій нітрату свинцю: *M* – маркер; 1 – контроль; 2 – 0,1 мкМ; 3 – 1,0 мкМ; 4 – 10,0 мкМ; 5 – 100 мкМ.

клітинах рослин. Отже, результати досліджень регенераційної здатності та стану хлорофілу, а також електрофоретичний аналіз множинних молекулярних форм естерази вказують на активацію адаптивних реакцій мохів *A. serpens* і *D. aduncus*, спрямованих на збереження гомеостазу за дії екстемальних факторів.

1. Андреева Е. Н. Влияние атмосферного загрязнения на моховый покров северотаежных лесов // Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. Л.: Наука, 1990. С. 159–172.
2. Бессонова В. П. Вплив важких металів на пігментну систему листка // Укр. ботан. журн. 1992. Т. 49. № 2. С. 63–66.
3. Горышина Т. К. Фотосинтетический аппарат растений и условия среды. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1989. 204 с.
4. Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиол. и биохим. культ. раст. 1994. Т. 26. № 2. С. 107–117.
5. Демкив О. Т., Сытник К. М. Морфогенез архегоният. К.: Наук. думка, 1985. 203 с.
6. Коршиков И. И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. К.: Наук. думка, 1996. 237 с.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
8. Маєвська С. М. Морфо-фізіологічні аспекти стійкості мохів до токсичної дії іонів важких металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, 2001. 21 с.
9. Малёва М. Г., Некрасова Г. Ф., Безель В. С. Реакция гидрофитов на загрязнение среды тяжелыми металлами // Экология. 2004. № 4. С. 266–272.
10. Соловченко А. Е., Чивкунова О. Б., Мерзляк М. Н., Решетникова И. В. Спектрофотометрический анализ пигментов в плодах яблони // Физиол. и биохим. культ. раст. 2001. Т. 48. № 5. С. 801–808.

11. Таланова В. В., Тимов А. Ф., Ботева Н. П. Влияние свинца и кадмия на проростки ячменя // Физиол. и биохим. культ. раст. 2001. Т. 33. № 1. С. 33–37.
12. Шалыго Н. В., Колесникова Н. В., Воронецкая В. В., Аверина Н. Г. Влияние катионов Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} на накопление хлорофилла и начальные этапы его образования в зеленеющих проростках ячменя // Физиол. растений. 1999. Т. 46. Вып. 4. С. 574–579.
13. Assche F., Clijsters H. Effect of metals on enzyme activity in plants // Plant. Cell Environ. 1990. Vol. 13. N 2. P. 195–206.
14. Chung L. K., Sawhney S. K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in the presence of cadmium // Plant Physiol. and Biochem. 1999 Vol. 37. P. 297–303.
15. Fey V., Wagner R., Brautigam K., Pfannschmidt T. Photosynthetic redox control of nuclear gene expression // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 1491–1498.
16. Krupa Z., Óquist G., Huner NPA. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis // Physiol. Plantarum. 1993. Vol. 88. P. 626–630.
17. Lowry O. A., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
18. Rothe G. Unterschiede im Enzymmuster von Protonema, Moospflänsche, Sporogon und Kallus der Laubmooskreuzung *Funaria hygrometrica* x *Physcomitrium pyriforme* // Beitr. Biol. Pflanz. 1972. Band 48. N 3. S. 433–444.
19. Taylor J. E. P., Schofield W. B., Elliot A. M. Analysis of moss degidrogenases by polyacrylamide disc electrophoresis // Can. J. Bot. 1970. Vol. 48. P. 367–369.
20. Taylor W. C. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Molecular Biol. 1989. Vol. 40. P. 211–233.
21. Wilkins D. S. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth // New Phytol. 1978. Vol. 80. N 3. P. 623–633.

EFFECT OF LEAD IONES ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDEXES OF MOSSES

O. Baik, O. Schcherbachenko

*Institute of Ecology of the Carpathians of NAS of Ukraine
11, Stefanyk St., Lviv 79000, Ukraine
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

It has been shown that intensity of chlorophyll luminescence was reduced in the moss *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. 1,5–2,0 times and in the moss *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. 0,8–0,9 times as much as in control when lead concentration in the medium was raising up to 100,0 $\mu\text{mol/l}$; tolerance index was 60% and 40%, respectively. Weakening of intensities of activity bands of esterase fractions with MM 29 and 45 kD in *A. serpens* and, in addition, appearance of fractions with 66 and 132 kD in *D. aduncus* were found electrophoretically. Thus interrelation between lead induced photosynthetic, growth and biochemical changes were stated.

Key words: lead, mosses, tolerance index, chlorophyll luminescence, multiple esterase molecular forms.

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВИНЦА
НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МХОВ****О. Банк, О. Щербаченко**

*Институт экологии Карпат НАН Украины
ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

Показано, что с повышением концентрации свинца в среде до 100,0 мкМ снижалась интенсивность люминесценции хлорофилла листьев мхов *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. и *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp в 1,5–2,0 и 0,8–0,9 раза сравнительно с контролем; индекс толерантности составлял 60% и 48% соответственно. Электрофоретически показано уменьшение интенсивности фракций эстеразы с ММ 29 и 45 кД у *A. serpens*, кроме этого, у *D. aduncus* появились фракции с 66 и 132 кД. Установлена взаимосвязь между фотосинтетическими, ростовыми и биохимическими изменениями исследованных видов мхов под влиянием свинца.

Ключевые слова: свинец, мхи, индекс толерантности, люминесценция хлорофилла, множественные молекулярные формы эстеразы.

Стаття надійшла до редколегії 19.03.09

Прийнята до друку 16.04.09