

О.Л. БАЇК

Інститут екології Карпат НАН України
вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000

СИСТЕМА ЗАХИСТУ МОХІВ В УМОВАХ МЕТАЛЕВОГО СТРЕСУ

ключові слова: гаметофори моху, антиоксидантна система захисту моху, супероксиддисмутаза, каталаза, малоновий діальдегід

key words: mosses gametophyte, antioxidative defensive system of the moss, superoxide dismutase, catalase, malonic dialdehyde

O.L. BAIK

DEFENSIVE SYSTEM OF THE MOSS AGAINST METAL STRESS

Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine
11 Stephanyk Str., Lviv, 79000, Ukraine

For the defense from heavy metals oxidative destruction antioxidative defense system (AOS) including such important enzymes as superoxide dismutase (SOD) and catalase is used in plants. We have shown that in the moss *P. intermedia* such toxic metals as mercury and lead intensify the processes of lipid peroxidation. It has been established that sublethal concentrations of Pb^{2+} and Hg^{2+} increase 9-10 times and 2,1-2,5 times respectively the activity of SOD and catalase. Besides that the content of malonic dialdehyde was found to elevate as the oxidation processes' indicator.

Підвищення рівня техногенного забруднення й антропогенного навантаження спричиняють у рослин сповільнення кінетики росту та розвитку аж до появи видимих симптомів ураження – хлорозів і некрозів тканин листків. Токсичний вплив поллютантів, в першу чергу, проявляється на біохімічному рівні – це порушення фотосинтезу, дихання, біосинтезу ферментів і білків, потім на ультраструктурному, клітинному та тканинному рівнях. Дія поллютантів на мембранні білки призводить до порушення проникливості плазмалемі та виходу іонів [8]. Під час цього можливе утворення вільних радикалів, що призводять до порушення діяльності мембран хлоропластів і біоенергетичних процесів. Підвищений вміст важких металів (ВМ) у середовищі активує вільнорадикальні процеси. Американський учений І.Фридович [7] показав утворення кисневих радикалів у ферментативних реакціях і відкрив здатність знищувати (дисмутувати) деякі вільні радикали кисню за допомогою ферментів, що отримали назву супероксиддисмутаза (СОД).

Відомо, що у відповідь на дію стресора активуються процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Це одна із захисних реакцій організму. Важливим є те, що клітини усіх організмів володіють значним арсеналом механізмів, які контролюють утворення всіх форм активованого кисню і забезпечують захист від них. У рослин є система захисту від окислювальної деструкції – антиоксидантна система захисту (АОС) [1; 6; 7; 13]. У зв'язку з цим, питання впливу ВМ на морфо-фізіологічні ознаки та складові АОС захисту рослин, у

тому числі й мохів, є актуальним.

Об'єкти та методи досліджень

Досліджували вплив ртуті та свинцю на морфо-фізіологічні та біохімічні характеристики моху *Pottia intermedia*. У досліджах використовували гаметофори *P. intermedia*, які впродовж двох місяців вирощували на середовищі Кнопа із вмістом $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ та HgCl_2 у різних концентраціях (1,0-100,0 мкмоль/л). Аналізували вплив свинцю на морфо-фізіологічні параметри *P. intermedia* за такими показниками, як індекс толерантності (ІТ) та інтенсивність люмінесценції хлорофілу. Для визначення індексу толерантності *P. intermedia* використовували метод Д.С.Уілкінса [14]. ІТ визначали як відношення кількості регенерантів на середовищі з металом до їх кількості на контрольному середовищі у процентах. Морфометричні заміри проводили на регенованих ізольованих листках моху. Кількість регенованих гаметофорів на листок, довжину гаметофорів вимірювали окулярною лінійкою під біокулярним мікроскопом „Jenaval”. Визначення інтенсивності люмінесценції хлорофілу проводили на цитофлуориметрі [3].

Для аналізу антиоксидантних параметрів моху застосовували загальноприйняті методики [4; 9]. Принцип методу визначення СОД ґрунтується на відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами, які утворюються під час реакції між феназинметасульфатом і відновленою формою нікотинаміддинуклеотида (NAD-H). Принцип визначення каталази полягає в тому, що вона руйнує субстрат H_2O_2 , а незруйновану частину перекису водню, що залишилася, вимірюють за допомогою молібдату натрію. Для молібдена характерне утворення в умовах взаємодії з перекисом водню перекисних сполук Na_2MoO_6 , які мають жовтий колір. Інтенсивність процесів пероксидації ліпідів оцінювали за нагромадженням в гаметофорах моху малонового діальдегіду (МДА). Вміст білка в зразках визначали за Бредфордом [11].

Результати досліджень та їх обговорення

Важливим є питання діагностики порушень фізіолого-хімічних процесів у рослин, які спричинені катіонами важких металів (ВМ). Пігментна система багатьох рослин чутлива до їх дії, тому вміст хлорофілу використовується для біоіндикації забруднення навколишнього середовища як окремими токсикантами, так і їх комплексами [2; 5]. Установлено, що із підвищенням вмісту металу в середовищі сповільнювалася регенераційна спроможність, про що свідчить зниження ІТ моху *P. intermedia* (табл.). Крім цього, показано, що під впливом Pb^{2+} інтенсивність люмінесценції хлорофілу ізольованих листків *P. intermedia* істотно знижувалася (рис. 1).

Важкі метали спричинюють інтенсифікацію ПОЛ. Процеси ПОЛ за участю форм активованого кисню призводять до руйнування поліненасичених жирних кислот і збіднення клітин полярними та ненасиченими жирними кислотами, появи гідропероксидних угруповань у складі гідрофобної зони мембран.

Продукти ПОЛ здатні пригнічувати реплікацію ДНК та білковий синтез. Можлива поява внутрішньо- та міжмолекулярних помилок унаслідок вільнорадикальної полімеризації та поліконденсації з деякими продуктами ПОЛ. У відповідь на різні стресові фактори у клітинах рослин відбувається

збільшення вмісту малонового діальдегіду, що пов'язано з активацією у цих умовах вільнорадикальних реакцій. Отже, вміст МДА є показником активності окислювальних процесів, обумовлених кисневими радикалами.

Таблиця

Вплив нітрату свинцю на регенераційну здатність моху *Pottia intermedia*

Концентрація Pb(NO ₃) ₂ , мкмоль/л	Кількість аналізованих листочків	Кількість регерованих гаметофорів на 1 листок	Довжина гаметофорів, мм	ІТ, %
Контроль	30	4,2±0,01	5,1±0,02	
1,0	30	4,0±0,07	4,9±0,06	96
10,0	30	3,5±0,02	4,0±0,03	78
100,0	30	2,0±0,04	3,3±0,02	64

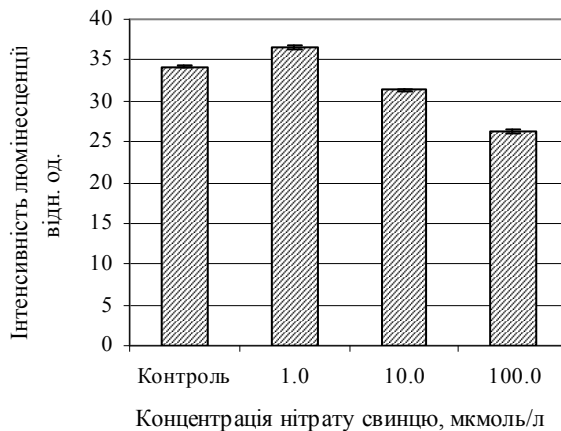


Рис. 1. Вплив нітрату свинцю на інтенсивність люмінесценції моху *Pottia intermedia*.

У зв'язку з цим проводилися дослідження впливу ВМ (Pb²⁺ та Hg²⁺) на функціонування складових антиоксидантної системи захисту моху *P. intermedia*. Ми встановили, що з підвищенням концентрації Pb²⁺ і Hg²⁺ у середовищі до 100 мкмоль/л відбувається зростання вмісту МДА у 2,1 та 2,6, відповідно (рис. 2).

До складових антиоксидантної системи захисту організму належать такі важливі ферменти, як супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза. СОД каталізує процес дисмутації супероксидних радикалів. У рослин присутні декілька СОД, що містять в активних центрах іони Cu, Zn, Fe чи Mn.

У найвищій концентрації цей фермент локалізований у хлоропластах. Виявилося, що СОД захищає від токсичної дії полютантів, які проникають у тканини листка [7]. Каталаза, що міститься в пероксисомах попереджує акумуляцію перекису водню, утвореного під час аеробного окислення [6].

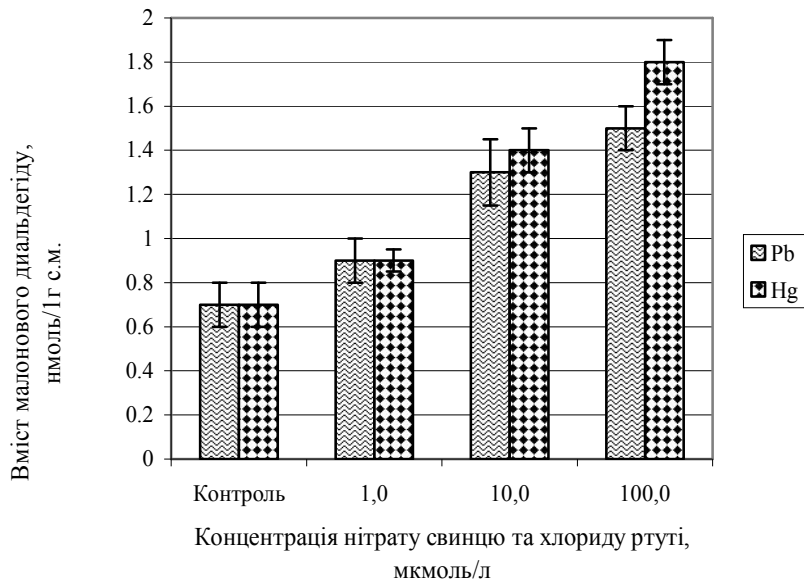


Рис. 2. Вплив $Pb(NO_3)_2$ та $HgCl_2$ на вміст малонового діальдегіду моху *Pottia intermedia*.

У квіткових рослин виявлено підвищення активності СОД під впливом токсичних металів, таких як свинець, кадмій та цинк [10; 12]. Ми встановили, що низькі концентрації Pb^{2+} та Hg^{2+} (1 мкмоль/л) у середовищі неістотно впливали на активність СОД. Із підвищенням вмісту цих металів у середовищі до 100 мкмоль/л активність СОД значно зростає у 9-10 разів, відповідно (рис. 3).

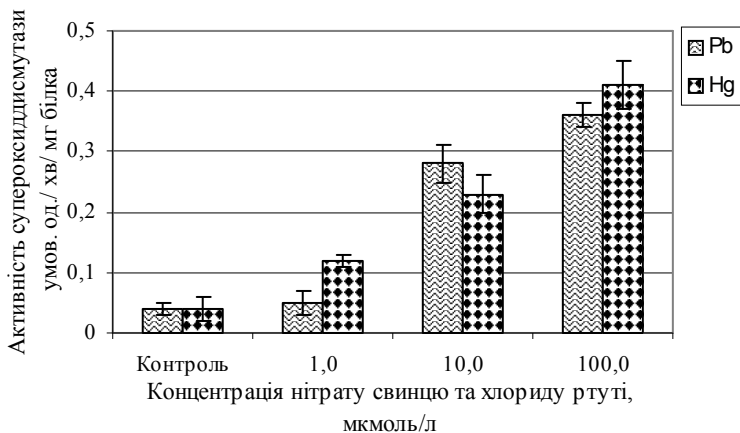


Рис. 3. Вплив $Pb(NO_3)_2$ та $HgCl_2$ на активність супероксиддисмутази моху *Pottia intermedia*.

Дослідження динаміки каталазної активності в гаметофорах *P. interme-*

дія під впливом свинцю та ртуті у концентрації 1,0-100,0 мкмоль/л вказують на подібну тенденцію, що й у випадку зі СОД. Установлено, що низькі концентрації свинцю та ртуті істотно не впливали на каталазну активність, тоді як високі концентрації (100,0 мкмоль/л) призводили до значного її зростання у 2,1 та 2,5 рази, відповідно (рис. 4).

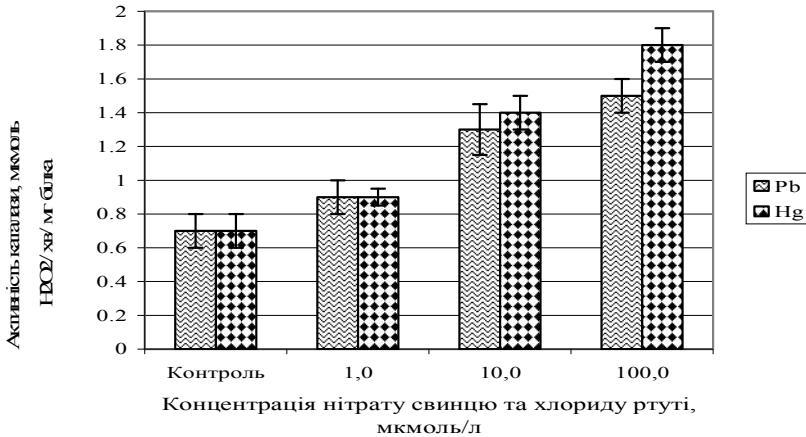


Рис. 4. Вплив $Pb(NO_3)_2$ та $HgCl_2$ на активність каталази моху *Pottia intermedia*.

Висновки

На підставі проведених досліджень показано, що такі токсичні метали, як ртуть і свинець спричиняють інтенсифікацію процесів перекисного окислення ліпідів у моху *P. intermedia*. Про це свідчить зростання вмісту МДА під впливом сублетальних концентрацій Pb^{2+} і Hg^{2+} . Крім цього, у відповідь на стрес, спричинений цими металами, зростає активність важливих антиоксидантних ензимів, таких як СОД і каталаза у клітинах моху *P. intermedia*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимирюв Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский Обозревательный Журнал. – 2000. – 6, № 12. – С. 13-19.
2. Данилова Н.Ф., Кравкина И.М., Кренг Р.Е., Печак Д.О. Влияние SO_2 на ультраструктуру устьиц и листьев (*Salicaceae*) // Укр. ботан. журн. – 1987. – 72, № 9. – С. 82-92.
3. Демкив О.Т., Сытник К.М. Морфогенез архегоният. – Киев: Наукова думка. – 1985. – 204 с.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. С. 16-19.
5. Кравкина И.М. Влияние атмосферных загрязнителей на ультраструктуру листьев // Укр. ботан. журн. – 1991. – 76, № 1. – С. 3-9.
6. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский Обозревательный Журнал. – 1999. – № 1. – С. 19-24.
7. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений // Соросовский Обозревательный Журнал. – 1999. – № 9. – С. 20-26.
8. Трешоу М. Загрязнение воздуха и жизнь растений. – Ленинград. Гидроме-

теоиздат. – 1988. – 536 с.

9. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 9-13.

10. Barkasdjieva N.T., Chrostov K.N., Christina K.N. //Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase // Biol. Plant. 2000. – 43. – P. 73-78.

11. Bredford W.A. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – № 72. – P 248-252.

12. Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. ev. Azar.) // J. Exp. Bot. – 2001. – 52. – P. 1101-1109.

13. Wulf G. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // Physiol. Rev. – 2002. – 82. – P. 47-95.

14. Wilkins D.S. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of oot growth // New Phytol. – 1978. – 80, № 3. – P. 623-633.