

ХАРАКТЕРИСТИКА МІЦНОСТІ ЗВ'ЯЗКУ ХЛОРОФІЛУ З БІЛКОВО-ЛІПІДНИМ КОМПЛЕКСОМ У РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ ТА КАДМІЙ ХЛОРИДУ

Я. КАВУЛИЧ, І. БОЙКО, М. КОБИЛЕЦЬКА, О. ТЕРЕК

Львівський національний університет імені Івана Франка вул.Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна,
e-mail: biofr@franko.lviv.ua

Досліджено функціональний стан пігмент-білкових комплексів рослин пшениці (*Triticum aestivum* L.) за дії саліцилату й іонів кадмію. Міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом (ХБК) є важливим показником, адже від нього залежить функціональна активність фотосинтетичного апарату. Дослідження показали, що кадмій хлорид значно підвищує частку вилученого хлорофілу у листках пшениці, найбільше це проявлялось у 14-добових рослинах пшениці. Також, було встановлено високу чутливість хлорофілу b, щодо важкого металу, свідченням цього є зміна міцності зв'язку хлорофіл-білкових комплексів, у складі яких є саме хлорофіл b.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., кадмію хлорид, саліцилова кислота, міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом.

Вступ. Постійне збільшення обсягів виробництва, швидкий розвиток промисловості, активне продукування відходів промисловості, підприємств, електростанцій, транспорту спричинили нагромадження в навколишньому середовищі у великих кількостях довгоіснуючих радіонуклідів та іонів важких металів (Демків, Головач, 2003). Збільшення кількості іонів ВМ у навколишньому середовищі викликає особливий інтерес до вивчення їхніх функцій, будови і впливу на рослинний організм. Антропогенне надходження в біосферу деяких солей важких металів у багато разів перевищує їх природне надходження внаслідок вивітрювання гірських порід і винесення водами. Серед хімічних елементів важкі метали найбільш токсичні і поступаються рівнем своєї небезпеки лише пестицидам (Wood, 1974). Одним із найбільш поширених і небезпечних політантів навколишнього середовища є Кадмій (Cd). Акумуляція кадмію рослинами має тенденцію до зростання внаслідок широкого використання його в різних галузях промисловості (Терек, 2011). Найвища концентрація іонів кадмію в уражених рослин є завжди в коренях, нижча – у листках і генеративних органах, і практично відсутній цей метал у зерні (Гуральчук, 1994). Підвищені концентрації ВМ можуть призводити до загальних малоспецифічних фізіологічних та біохімічних змін. Найзагальнішими проявами фітотоксичності іонів важких металів є хлороз та затримка росту і розвитку. Характерними ознаками при надлишку ВМ у рослинному організмі є пошкодження мембран, зміна активності ферментів, інгібування росту коренів. Усі ці зміни спричинюють низку вторинних ефектів, таких як гормона-

льний дисбаланс, дефіцит мінеральних елементів, інгібування фотосинтезу, порушення транспорту асимілятів, зміна водного режиму, які у свою чергу затримують загальний ріст і розвиток рослини (Barcelo, 1990). Зміна стану хлорофіл-білково-ліпідного комплексу при дії на рослини ВМ практично не вивчена. Поліфункціональною сполукою із стрес протекторними властивостями є саліцилова кислота (СК). У рослині СК являє собою внутрішній сигнал на негативний фактор, який індукує важливі біохімічні елементи стійкості (Khodary, 2004). Захисні ефекти екзогенної саліцилової кислоти спостерігались за умов дії важких металів на рослину, зокрема кадмію, нікелю, плюмбуму. У цьому випадку СК викликала позитивний вплив на функціонування фотосинтетичного апарату, зберігала нормальну активність антиоксидантних ферментів. СК впливає на вміст в рослинах низькомолекулярних антиоксидантів (Колупаєв, 2010). Зокрема, при обробці рослин екзогенною СК спостерігається зростання вмісту ендогенної саліцилової кислоти, аскорбінової кислоти, глутатіона і каротиноїдів (Шакирова, 1997).

Матеріали і методи. Об'єктом нашого дослідження були рослини пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту "Подолька", вирощені методом піщаних культур. Насіння попередньо замочували у дистильованій воді (контроль) та 0,5 мМ розчині СК протягом п'яти годин та пророщували на зволоженому фільтрувальному папері у чашках Петрі в термостаті, при температурі 23° С протягом трьох діб. Кадмієвий стрес моделювали шляхом внесенням 25 мг кадмій хлориду на кг субстрату. На 14-ту, 21-шу та 28 добу в дослідних та контро-

льних рослин визначали міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом.

Для аналізу брали чотири наважки по 0,2 г поміщали в ступки, додавали по 0,4 г безводного сульфату натрію та 0,05 г вуглекислого магнію. Проби розтирали до повного висушування. До першої наважки додавали 10 мл бензину, що містив 0,2 % етилового спирту, до другої - 10 мл бензину, що містив 0,4 % етилового спирту, до третьої - 10 мл бензину, що містив 0,8 % етилового спирту, до четвертої - 10 мл бензину, що містив 1,2 % етилового спирту, знову розтирали. Вміст ступок переносили на скляні фільтри Шота, розчиняли, розчини відфільтровували, а залишки промивали відповідними розчинами, щоразу відсмоктуючи промивну рідину доки не одержали 10 мл фільтрату. Після цього виміряли оптичну густину розчину на довжині хвиль 640-660 нм, за допомогою ФЕКу. Для одержання нерозчинного хлорофілу, що залишився на фільтрі додавали 10 мл 90 %-го етилового спирту, об'єм екстракту доводили спиртом до 10 мл і виміряли оптичну густину розчину. Обчислювали кількість неекстрагованого хлорофілу (мкг). Після цього обчислювали міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом за формулою (Третьякова, 1998).

Результати та їх обговорення. ВМ спричиняють негативний вплив на всі біохімічні та морфометричні показники рослинного організму. Найчутливішим до дії іонів важких металів є фотосинтетичний апарат. Іони ВМ знижують якісні та кількісні показники пігментної системи. Щоб повно охарактеризувати стан пігментної системи за дії важких металів, слід пам'ятати, що фотосинтетичний апарат є скоординованою системою компонентів, які невідривно пов'язані між собою (Бессонова, 2006). Хлорофіл та інші фотосинтетичні пігменти зв'язані з ліпопротеїдним комплексом мембран. Функціональна активність хлорофілу залежить від міцності зв'язку його з білково-ліпідним комплексом. Міцність зв'язку, своєю чергою, залежить від багатьох факторів, а саме від: концентрації метала-забруднювача, виду рослини та умов зростання. Згідно літературних даних, збільшення міцності зв'язку ХБК під впливом іонів ВМ спостерігається у толерантних видів, та знижується у чутливих (Бессонова, 2006).

За дії кадмієвого стресу ми спостерігали зміни функціонального стану пігментів фотосинтезу, зокрема встановлено негативний вплив іонів Cd спостерігається на взаємодію хлорофілу з білково-ліпідним комплексом. Міцність такого зв'язку послаблюється, про що свідчить збільшення кількості вилучених хлорофілів. Ймовірно, це відбувається внаслідок порушення гідрофобної взаємодії хлорофілу з мембранами білків та ліпідів.

За кількістю екстрагованого хлорофілу можна зробити висновок про міцність зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом. За умови впливу кадмій хлориду спостерігали вилучення як слабкозв'язаних, так і сильнозв'язаних форм хлорофілу. За результатами досліджень можна зробити висновок, що іони кадмію значно підвищують частку вилученого 60% ацетоном хлорофілу з листків пшениці. Прояв негативного ефекту був найбільш істотним у 14-добових рослин. Відомо, що для нормального функціонування фотосинтетичного апарату має значення також певне співвідношення хлорофілів *a* та *b* (Кобилецька, 2012). Зміна співвідношення хлорофілів *a* та *b* за впливу різних несприятливих екологічних факторів певною мірою відображає функціонування хлоропластів. При малому значенні цього показника спостерігається найменший вміст хлорофілу на гранах. Підвищення цього співвідношення зменшує ступінь агрегації тилакоїдів у мембранах хлоропластів (Гавриленко, 1985) Деякі автори вказують на те, що зниження співвідношення хлорофілів *a* / *b* може характеризувати стійкість рослин (Молодченкова, 2001; Серегин, 1997)

Згідно наших спостережень зміни нативності хлорофіл-білкових комплексів у складі яких є саме хлорофіл *b*. За таких стресових умов саліцилова кислота мала позитивний вплив на хлорофіл-білкові комплекси за умови кадмієвої токсичності. Найвища міцність хлорофіл-білкових комплексів щодо контролю спостерігалась за дії саліцилової кислоти.

Гідрофобний зв'язок каротиноїдів з мембранами тилакоїдів за дії іонів кадмію на 14-ту добу росту рослин зростає, але послаблюється на 21-шу та 28-шу доби росту. Можна припустити, що причиною цього є активація захисних механізмів рослинного організму на 14-добу росту рослин із його подальшим поступовим зниженням їхньої інтенсивності унаслідок виснаження енергетичних і пластичних ресурсів. За дії СК на 14-ту добу росту спостерігається зниження міцності зв'язку каротиноїдів з пігмент-білковим комплексом, але на 21-шу і 28-му добу росту цей показник зростає.

Від міцності зв'язку пігментів з білково-ліпідним комплексом залежать їхня функціональна активність. Цей показник, змінюючись під впливом факторів довкілля, залежить від сили та характеру впливу, а також від видових особливостей рослин.

Описані результати модифікації стану пігмент-білкових комплексів у листках пшениці за дії іонів кадмію та саліцилової кислоти свідчать про те, що саліцилова кислота має здатність впливати на організацію цих комплексів.

Міцність зв'язку фотосинтетичних пігментів із білково-ліпідним комплексом у листках пшениці
(% вилучених пігментів)

Варіант	Міцність зв'язку пігмент-білкових комплексів, % вилученого хлорофілу			
	Хлорофл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Хлорофіли <i>a+b</i>	Каротиноїди
<i>14-а доба</i>				
Контроль	2,2±0,1	13,4±0,4	4,3±0,2	18,5±1,1
СК	3,4±0,2	5,5±0,2	3,7±0,1	32,8±1,4
Cd	23,5±1,2	55,3±1,3	27,9±1,7	47,3±2,5
СК + Cd	11,1±0,5	11,6±0,3	10,7±0,3	57,5±1,2
<i>21-а доба</i>				
Контроль	15,7±0,5	24,1±1,4	18,3±0,5	44,3±2,3
СК	6,2±0,3	5,4±0,2	6,1±0,2	24,5±1,6
Cd	18,4±0,5	36,6±1,9	21,7±0,6	52,6±1,5
СК + Cd	13,9±0,7	11,3±0,6	15,5±1,0	34,1±0,9
<i>28-а доба</i>				
Контроль	11,4±0,7	23,3±0,8	13,2±0,7	28,8±0,9
СК	8,2±0,3	9,7±0,5	10,0±0,6	24,4±0,8
Cd	15,5±5,9	42,3±2,2	25,2±0,9	31,0±1,6
СК + Cd	11,1±0,6	8,1±0,3	10,3±0,5	23,2±1,2

Високий ступінь мінливості зв'язку хлорофілу з ліпопротеїдами мембран тилакоїдів, ймовірно є результатом участі даного пігменту в світло збиральному комплексі, яка полягає у сприянні правильному розміщенню хлорофілу *a* та білків (Hoover, 2007). Механізм впливу саліцилової кислоти на пігмент білкові комплекси за стресових і нестресових умов можуть полягати у регуляції активності ферментів метаболізму хлорофілу чи зниженні інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів, які мають модифікаційний вплив на стан пігмент-білкових комплексів (Yamauchi; 2010).

Загалом саліцилова кислота посилювала зв'язок каротиноїдів з білково-ліпідним комплексом мембран тилакоїдів як за стресових, так і не стресових умов.

Характер впливу СК на стабільність пігмент-білково-ліпідних комплексів подібний у хлорофілів та каротиноїдів.

Висновки. Хлорофіл-білкові комплекси виступають мішенями дії іонів важких металів, зокрема кадмію. Отримані результати є важливим доказом ефективності протекторного впливу СК до токсичної дії кадмію. Як свідчать результати наших досліджень, пре інкубація саліцилатом призводить до покращення стану пігмент-білкових комплексів, що є важливою стадією

адаптації метаболізму рослини за стресових умов, адже дає змогу ефективніше акумулювати енергію на цьому етапі фотосинтезу.

Список літератури:

1. Бессонова В.П. Влияние тяжелых металлов на фотосинтез растений // Днепропетровский ГАУ. 2006. С. 123-124.
2. Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. 1994. 26. №2. С. 107-117
3. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. М.: Высш. Школа, 1985. 392с.
4. Демків О.Т., Головач О.М. Фіторемедіація – ефективний метод очищення забруднених важкими металами ґрунтів // Науковий вісник львівської національної академії ветеринарної медицини імені С.З. Гжицького.- 2003. Т. 5, №4 – С.21-27.
5. Кобилецька М.С., Маленька У. Вплив саліцилової на вміст фотосинтетичних пігментів у рослинах кукурудзи за дії кадмію хлориду // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. 2012. Вип. 58. С. 300-308.
6. Колупаев Ю.Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. К.: Основа, 2010. 352 с.
7. Молодченкова О. О. Предполагаемые функции саліцилової кислоти в растениях // Физиология

- и биохимия культ. растений. 2001. 33. №6. С.463-473.
8. Серегин И.В., Иванов В. Б. Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях // Физиология растений. 1997. Т.44. №6. С. 915-921.
 9. Терек О.І. Ріст і розвиток рослин: навч. посібник / Терек О.І., Пацула О.І. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 328 с.
 10. Третьякова Н.Н. Практикум по физиологии растений – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.
 11. Шакирова Ф.М. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к засолению среды / Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. – Изв. РАН Сер. Биол. – 1997. -№2. – С. 149–153.
 12. Barcelo J. Plant water relations as affected by heavy metal stress / Barcelo J. // J.Plant Nutr. – 1990. – 13, N 1. –P. 1–37.
 13. Khodary S. Effect of salicylic acid on the grown, photosynthesis and carbohydrate metabolism in sat-stressed maize plants // Int. J. Agric. Biol. Vol.6.2004. P. 5-8
 14. Hooper J.K. Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts / J.K.Hooper, L.L. Eggink, M.Chen // Photosynth.
 15. Yamachi Y. Effekt of protein modification by malondialdehyde on the interaction between the oxygen-evolving complex 33 kDa protein and photosystem II core proteins / Y. Yamachi, Y.Sugimoto // Planta – 2010 – Vol.231. – P.1077-1088.
 16. Wood J.M. Biological cycles for toxic element in the environment / Wood J.M. // Science. – 1974. – 183. – N 4129. – P. 1049–1059.

DESCRIPTION STRENGTH OF CHLOROPHYLL A PROTEIN-LIPID COMPLEXES IN WHEAT PLANTS FOR ACTION SALICYLIC ACID AND CADMIUM CHLORIDE

J. Kavulych, I. Boyko, M. Kobyletska, O. Terek

*Lviv National Ivan Franko University ul.Grushevskogo, 4, m. Lviv, 79005, Ukraine,
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

*Functional status pigment-protein complexes of wheat (*Triticum aestivum* L.) for the actions of salicylate and cadmium ions. The strength of the connection chlorophyll protein-lipid complex (HBC) is an important show-ber, because it depends on the functional activity of photosynthetic apparatus. Research shows-whether that cadmium chloride significantly increases the proportion of remote chlorophyll in leaves of wheat is most manifest elk in 14-day- old wheat plants. Also, it was found high sensitivity of chlorophyll b, about heavy metal, evidence of this is the change in strength of chlorophyll-protein complexes, which include those is exactly chlorophyll b.*

*Keywords: *Triticum aestivum* L., cadmium chloride, salicylic acid, chlorophyll strength of the bond with the protein- in-lipid complex.*

Одержано редколегією 15.09.2013