

УДК 582.32:54.06

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЙ МОХУ *DREPANOCLADUS ADUNCUS* (HEDW.) WARNST. НА ДІЮ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

© 2007 р. О. І. Щербаченко, О. Т. Демків

Інститут екології Карпат
Національної академії наук України
(Львів, Україна)

Проаналізовано морфологічні параметри гаметофорів, вміст хлорофілів, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і активність основних ферментів антиоксидантної системи (АОС) у гігрофітного моху *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. за дії іонів свинцю і кадмію. Встановлено зміни, які виявлялися в інгібуванні росту, зниженні вмісту хлорофілів, підвищенні рівня ПОЛ і активності основних ферментів АОС. Зроблено висновок, що особливості морфо-фізіологічних реакцій *D. aduncus* на дію важких металів відображають процеси толерантної стратегії адаптації.

Ключові слова: *Drepanocladus aduncus*, свинець, кадмій, ростові процеси, хлорофіли, пероксидне окиснення ліпідів, ферменти антиоксидантного захисту, толерантність

Адаптація рослин до несприятливих чинників може здійснюватися із використанням толерантної або резистентної стратегій. Толерантна стратегія виживання властива більш давнім групам рослин, резистентна, навпаки, реалізується у складніше організованих групах.

Для мохів як давніх наземних рослин характерна переважно толерантна стратегія виживання, хоча у них нерідко трапляються і прояви резистентної стратегії. Толерантна стратегія ґрунтується на мінімалізації життєвих процесів у несприятливих природних умовах. У таких умовах дернинки мохів повністю втрачають вологу і призупиняють ріст, однак вже з першими краплями дощу відновлюють функціональну і ростову активність [1]. Основна перевага толерантної стратегії мохів полягає у тому, що вона дає можливість виживати у край несприятливих умовах. Така стратегія є вичікувальною, тобто сприяє тимчасовому виживанню організму, однак не вирішує ніяких адаптивних завдань, таких як еволюційне пристосування [29]. Крім того, вона обтяжена певними втратами і тому надмірна стратегія толерантності може призвести до летальних наслід-

ків. Шок – крайня межа, яка передуює такому стану.

Одним з проявів толерантної стратегії є виживання мохів в умовах дії токсичних речовин. Специфіка анатомо-морфологічної структури, здатність нагромаджувати іони важких металів (ВМ) та чітка кореляція з їх вмістом у середовищі, а також толерантність до підвищених концентрацій поллютантів стали передумовою для використання бріофітів як біоіндикаторів забруднення атмосферного та водного середовищ [17, 24-28]. Відомо, що вплив свинцю і кадмію призводить до зростання у рослинному організмі вмісту активних форм кисню (АФК), які ініціюють пероксидне окиснення ліпідів [21]. Негативну дію АФК в організмі послаблює антиоксидантна система (АОС), функціонування якої спрямоване на попередження утворення вільних радикалів, їх нейтралізацію та репарацію пошкоджень [7, 23]. Однак інформації про морфо-фізіологічні реакції мохів і функціонування їх захисних систем в умовах оксидного стресу, індукованого іонами ВМ, недостатньо. У зв'язку з цим ми досліджували морфометричні параметри пагонів, вміст хлорофілів, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і активність основних ферментів антиоксидантної системи (АОС) у гігрофітного

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЙ МОХУ

моху *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. залежно від дії свинцю і кадмію.

МЕТОДИКА

Пагони моху *D. aduncus* вирощували на водних поживних середовищах Кноп-II: дослідні - з вмістом 0,1-100,0 мкмоль/л $Pb(NO_3)_2$ і 0,1-10,0 мкмоль/л $CdCl_2$, контрольні - без солей ВМ. Концентрації солей ВМ було підібрано експериментально шляхом аналізу їх впливу на ріст і розвиток моху. Культури росли впродовж 1 місяця в люмінестаті у контрольованих умовах освітлення ($2,5 \pm 0,2$ тис. лк.), температури ($20-22^\circ C$) та вологості [5]. Аналізували спосіб галушення й швидкість росту пагонів регенеративної протонеми. Морфометричні параметри вимірювали під бінокулярним мікроскопом „Jenaval”. Вміст хлорофілів визначали в ацетонній витяжці без попереднього їх розділення [12]. Концентрацію пігментів обчислювали за рівняннями Хольма–Ветштейна і виражали у мг/г сирової маси [30]. Інтенсивність процесів ПОЛ в рослинному матеріалі оцінювали за вмістом тіобарбітуратактивних сполук (в основному малоновий діальдегід) за методом [12] у перерахунку на 1 г сирової маси. Активність антиоксидантних ферментів визначали за стандартними методиками: супероксиддисмутази (СОД КФ 1.15.11) – за методом, який ґрунтується на відновленні нітросинього тетразолію супероксидними радикалами [16], каталази (КФ 1.11.16) – за швидкістю розклаття пероксиду водню [8], глутатіон-пероксидази (ГП КФ 1.11.19) – за методом, в основі якого кольорова реакція із реактивом Елмана [11]. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [20].

Досліди виконували у 3-5-разовій повторності. Дані опрацьовували статистично із застосуванням пакета прикладних програм „Excel”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень свідчать, що вирощування пагонів моху *D. aduncus* у поживних середовищах із різними концентраціями свинцю і кадмію зумовлювало значні порушення метаболічних процесів. Із підвищенням концентрації металів у середовищі знижувалася загальна ростова активність клітин та поступово знижувався приріст пагонів. Так, свинець у концентраціях 10,0-100,0 мкмоль/л і кадмій – 1,0-10,0 мкмоль/л пригнічували ріст і диференціацію протонеми, довжину клітин і загалом розвиток мохової дернинки (табл. 1). За впливу 100,0 мкмоль/л Pb^{2+} і 10,0 мкмоль/л Cd^{2+} відбувалися гальмування регенерації пагонів *D. Aduncus*, некроз клітин і швидке відмирання листків.

Значні відмінності у гаметофорах *D. aduncus* спостерігали і за дії нижчих концентрацій свинцю (0,1-1,0 мкмоль/л), які викликали зміну забарвлення листків та появу некротичних плям. У пагонах, які виростили на середовищах із 0,1 мкмоль/л $CdCl_2$, окрім візуальних змін, простежували також уповільнення їх розвитку. Це може свідчити про чутливість не лише ростових, а й морфогенетичних процесів у пагонах моху до впливу Cd^{2+} . Під дією Pb^{2+} і Cd^{2+} уповільнювалися процеси закладання пагонів, змінювалася форма листків, зменшувалася довжина і ширина їх клітин, що призводило до зміни габітусу рослин. Подібні зміни морфологічних ознак квіткових рослин (зменшення розмірів листків, затримка росту, переважання розвитку кореневої системи над надземною частиною) під дією важких металів вважають проявом адаптації організму до стресових ситуацій [4, 14, 15]. Пригнічення ростових процесів рослин є одним із перших симптомів інтоксикації і призводить до зниження темпів репродукції, оскільки іони важких металів спричинюють зниження інтенсивності клітинних поділів і

Таблиця 1

Вплив важких металів на ріст пагонів моху *Drepanocladus aduncus*, $M \pm m$

Вміст металу, мкмоль /л	Pb^{2+}			Cd^{2+}		
	Розміри листка,мм		Довжина пагонів, см	Розміри листка,мм		Довжина пагонів, см
	Довжина	Ширина		Довжина	Ширина	
Контроль	2,64±0,05	0,78±0,01	9,74±0,13	2,64±0,05	0,78±0,01	9,74±0,13
0,1	1,71±0,01	0,41±0,02	9,01±0,14	2,09±0,01	0,31±0,08	8,21±0,11
1,0	1,79±0,04	0,36±0,08	9,21±0,11	1,74±0,09	0,36±0,02	6,02±0,32
10,0	1,54±0,09	0,39±0,02	8,02±0,50	1,58±0,02	0,29±0,03	5,30±0,21
100,0	1,28±0,02	0,20±0,03	6,53±0,12	—	—	—

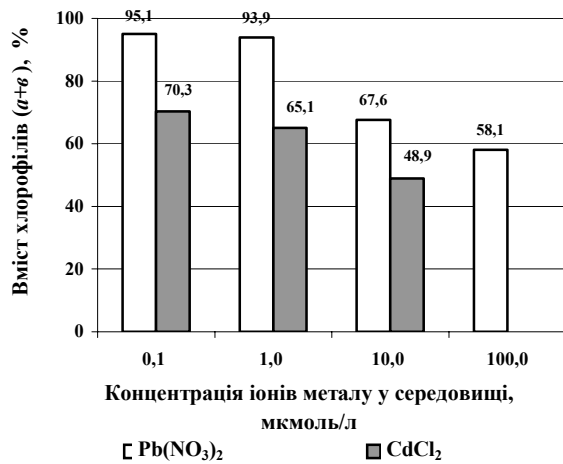


Рис. 1. Вміст хлорофілів (a+b) у пагонах гігрофітного моху *D. aduncus* залежно від дії свинцю і кадмію (контроль прийнято за 100%).

зміни співвідношення клітин в окремих фазах мітозу [9, 10].

Одним із загальних показників уповільнення ростової активності є зміна вмісту хлорофілу. Вміст пігментів і їх стан – це інтегральний показник, який визначає не лише розвиток і активність фотосинтетичної системи, а й характеризує продуктивність, життєздатність і стійкість рослин [2, 13]. Відомо, що під впливом надлишку важких металів порушується функціонування пігментної системи рослинних організмів, змінюється склад і кількість пігментів [2, 3, 6].

Досліджено вміст хлорофілів у листках моху *D. aduncus*, який вирощували на середовищах із різними концентраціями свинцю та кадмію. Виявлено, що підвищені концентрації Pb²⁺ (10,0 і 100,0 мкмоль/л) спричинювали різке зниження вмісту хлорофілів (a+b) порівняно з контролем, вплив нижчих концентрацій металу (0,1 і 1,0 мкмоль/л) був менш помітним (рис. 1). Відомо, що реакція пігментної системи на стрес є двофазною: стадія стимуляції змінюється стадією депресії [6]. Збереження вмісту хлорофілів у листках *D. aduncus* на високому рівні за дії нижчих концентрацій іонів свинцю відображає початкову реакцію рослин на стрес, коли посилювався синтез пігментів та активно працювали захисні системи хлоропластів. Під впливом підвищених концентрацій металу пригнічувалися репараційні можливості пігментної системи і відбувалося істотне руйнування хлорофілів.

У дослідах із кадмієм простежували іншу тенденцію: за дії 0,1-10,0 мкмоль/л Cd²⁺ спостерігалось значне зниження вмісту хлорофілів у листках моху *D. aduncus* порівняно з контролем (рис. 1). Це вказує на вищу токсичність Cd²⁺.

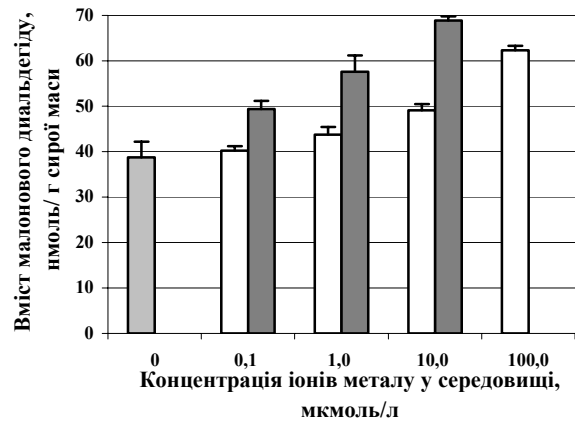


Рис. 2. Вплив іонів свинцю і кадмію на інтенсивність ПОЛ у пагонах гігрофітного моху *D. aduncus*. Позначення як на рис. 1.

Аналізуючи зміни вмісту хлорофілів *a* і *b*, виявили, що підвищені концентрації іонів важких металів сильніше впливали на вміст хлорофілу *a*, ніж хлорофілу *b*, зумовлюючи зростання співвідношення величин хлорофіл *b*/хлорофіл *a*. Можливо, це пов'язано з порушенням пропорції між світлозбиральним комплексом і кількістю реакційних центрів, оскільки хлорофіл *a* належить до тилакоїдних пігмент-білкових комплексів, а хлорофіл *b* – до світлозбиральних [3]. Зниження вмісту хлорофілу у листках моху *D. aduncus* відповідно пришвидшувало процеси їх старіння, що виявлялося в їх поступовому побурінні.

Руйнуванню хлорофілу передують зміни в пластидах, а саме зростання рівня вільнорадикального окиснення ліпідів мембран хлоропластів, що призводить до порушення гідрофобного зв'язку хлорофілів з мембранами пластид [2, 13]. Одним із кінцевих продуктів ПОЛ є малоновий діальдегід (МДА). Встановлено, що концентрація МДА у клітинах суттєво зростає у відповідь на різні стресові впливи і є показником активності вільнорадикальних окиснювальних процесів у клітинах [21, 23].

Аналіз вмісту МДА у пагонах моху *D. aduncus* свідчить, що за впливу 0,1-1,0 мкмоль/л Pb(NO₃)₂ рівень окиснювальних процесів у клітинах моху залишався стабільним і вміст МДА мало відрізнявся від контролю. Із підвищенням концентрацій нітрату свинцю до 10,0-100,0 мкмоль/л зафіксовано істотне зростання вмісту МДА порівняно з контролем. Під впливом кадмію вміст МДА зростав пропорційно до підвищення концентрації металу у субстраті (рис. 2).

Вплив важких металів на активність ферментів антиоксидантної системи у пагонах гігрофітного моху *D. aduncus*

Концентрація іонів металу, мкмоль/л		Активність ферменту, М±m		
		СОД, ум.од./ (мг білка·хв)	каталази, мкМ H ₂ O ₂ / (мг білка·хв)	ГП, мкМ/(г білка·хв)
Контроль		0,12±0,04	1,23±0,01	47,2±2,9
CdCl ₂	0,1	0,34±0,02	1,61±0,02	64,7±1,7
	1,0	0,47±0,03	2,97±0,05	66,5±2,2
	10,0	0,49±0,09	3,17±0,03	73,4±1,3
Pb(NO ₃) ₂	0,1	0,21±0,04	1,26±0,01	61,3±5,9
	1,0	0,28±0,01	1,64±0,05	74,5±0,7
	10,0	0,43±0,01	2,34±0,07	78,9±0,1
	100,0	0,52±0,09	2,81±0,04	91,1±1,1

Важливим регулятором інтенсивності ПОЛ у клітині є антиоксидантна система (АОС), до складу якої входять ферменти (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза та інші) і низькомолекулярні метаболіти – глутатіон, аскорбінова кислота, захисні білки, каротиноїди, α -токоферол, феноли та інші сполуки, які можуть знешкоджувати високоактивні кисневі інтермедіати або відігравати роль субстратів для захисних ферментів. Супероксиддисмутаза (СОД) каталізує реакцію дисмутації супероксидного радикала O₂⁻ до молекулярного кисню та пероксиду водню і забезпечує первинний внутрішньоклітинний захист в умовах окислювального стресу [19]. Ми виявили, що активність СОД у пагонах моху зростала пропорційно вмісту важких металів у середовищі (табл. 2). Подібні результати було отримано раніше у дослідках із квітковими рослинами [18, 22].

Пероксид водню, який у підвищених концентраціях утворюється в умовах стресу, знешкоджується каталазою. У пагонах *D. aduncus* рівень каталазної активності суттєво зростав під впливом 10,0-100,0 мкмоль/л Pb(NO₃)₂ і 1,0-10,0 мкмоль/л CdCl₂ (табл. 2). Можливо, це пов'язано із збільшенням вмісту H₂O₂, який утворюється в супероксиддисмутазній реакції, оскільки активність СОД теж істотно зростала. Подібну тенденцію зафіксовано і щодо впливу іонів кадмію. Отже, у захисті клітин від окислювального стресу, зумовленого вищим вмістом H₂O₂, каталаза виконує важливу роль.

У редукції цитотоксичних гідропероксидів в цитозолі та хлоропластах рослинних

клітин значною мірою задіяна глутатіонпероксидаза (ГП). У дослідках свинець і кадмій індукували підвищення активності ГП у пагонах моху *D. aduncus* (табл. 2). Є відомості, що ГП ефективніше, ніж каталаза, інактивує H₂O₂, що може пояснюватися її вищою спорідненістю до H₂O₂ або підвищеною стійкістю ферменту до впливу важких металів [23].

Таким чином, на підставі проведених досліджень можна стверджувати, що гігрофітний мох *D. aduncus* чутливо реагує на вплив свинцю і кадмію. Виразні токсичні ефекти виявилися за концентрації Pb(NO₃)₂ 100,0 мкмоль/л і CdCl₂ 10,0 мкмоль/л. Проявами токсичності важких металів було уповільнення швидкості росту пагонів, а також зниження вмісту хлорофілу ($a+v$). Підвищений рівень ПОЛ у гаметофорах *D. aduncus* активував функціонування основних компонентів АОС, що є одним із найважливіших механізмів захисту в умовах стресу і визначає адаптивний потенціал даного виду за токсичного впливу важких металів. Виявлені особливості морфо-фізіологічних реакцій моху *D. aduncus* на дію іонів свинцю і кадмію відображають процеси толерантної стратегії адаптації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бардунов Л.В. Основные аспекты применения мохообразных // Ботан. журн. – 1989. – Т. 74, №3. – С. 416-424.
2. Безсонова В.П. Вплив важких металів на пігментну систему листка // Укр. ботан. журн. – 1992. – Т. 49, № 2. – С. 63-66.

ЩЕРБАЧЕНКО, ДЕМКІВ

3. Горышина Т.К. Фотосинтетический аппарат растений и условия среды. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1989. – 204 с.
4. Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений– 1994. – Т. 26, № 2. – С. 107-117.
5. Демкив О.Т., Сытник К.М. Морфогенез архегониат. – Киев: Наук. думка, 1985. – 204 с.
6. Золотухина Е.Ю., Гавриленко Е.Е., Бурдин К.С. Влияние ионов свинца и меди на фотосинтез и дыхание морских водорослей // Физиология растений. – 1987. – Т. 34, вып.2. – С.266-275.
7. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. – Киев: Наук. думка, 2003. – 277 с.
8. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1986. – № 1. – С. 16-20.
9. Лобачевська О.В., Демків Л.О., Кардаш О.Р. Вплив свинцю на ріст і розвиток мохів // Укр. ботан. журн. – 1992. – Т. 49, № 2. – С. 50-56.
10. Мельничук Ю.П. Влияние ионов кадмия на клеточное деление и рост растений. – Киев: Наук. думка, 1990. – 148 с.
11. Моин В.М. Простой и специфический метод для определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело – 1985. – № 12. – С. 724-726.
12. Мусиенко М.М., Паршикова Т.В., Славный П.С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений. – Киев: Фитосоциоцентр, 2001. – 200 с.
13. Полищук Р.А. Реакция макрофитов обрастания на воздействие ионов тяжелых металлов // Биологические основы борьбы с обрастанием. – Киев: Наук. думка, 1973. – С. 155-193.
14. Таланова В. В, Титов А.Ф., Боева Н.П. Влияние свинца и кадмия на проростки ячменя // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, №1. – С. 33-37.
15. Терек К., Головач О., Терек О. Ростові процеси у рослин кукурудзи та зміни у фітогормональному комплексі за дії несприятливих температур // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2004. – Вип. 15. – С. 152-155.
16. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. – 1991. – № 3. – С. 95-99.
17. Щербаченко О.І. Мох *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. як перспективний вид для біоіндикації забруднення природного середовища // Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти: Тези доп. II Міжнародної наукової конференції (м. Львів, серпень 2004 р.). – Львів, 2004. – С. 337.
18. Bakardjieva N.T., Chrostov K.N., Christina K.N. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase // Biol. Plant. – 2000. – V. 43. – P. 73-78.
19. Bowler C., Van Montagu M., Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance // Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1994. – V. 43. – P. 83-116.
20. Bredford W. A. simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-252.
21. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. – 2001. – V. 212. – P. 475-486.
22. Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea // J. Exp. Bot. – 2001. – V. 52. – P. 1102-1109.
23. Foyer C.H., Lelandais M., Galap C., Kunert K.J. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling // Physiol. Plant. – 1997. – V. 100. – P. 241-254.
24. Gloschenko A.A. *Spahnum fuscum* moss as an indicator of atmospheric cadmium deposition across Canada. // Environ. Pollut. – 1995. – V. 57. – P. 23-33.
25. Grodzinska K., Szarek-Lukashevskaja G. Response of mosses to the heavy metal deposition in Poland – an overview // Environ. Pollut. – 2001. – V. 114, №3. – P. 443-451.
26. Mouvet C. Accumulation et relargage de plomb, zinc, cadmium, chrome et cuivre par des mousses aquatiques en milieu naturel et au laboratoire // Intern. Report. Laboratoire d' Ecologie, Universite de Metz. – 1987. – P. 1-122.
27. Onianwa P.C. Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators // Environ. Monit. Asses. – 2001. – V. 71, №1. – P. 13-50.
28. Reimann C., Niskavaara H., Kashulina G. et al. Critical remarks on the use of terrestrial moss (*Hypnum splendens* and *Pleurozium schreberi*)

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЙ МОХУ

- for monitoring of airborne pollution // Environ. Pollut. – 2000. – V. 113, №1. – P. 41-57.
29. Richardson D.H.S. The biology of mosses. – Oxford: Blackwell scientific publication, 1981. – 220 p.
30. Wettstein D. Von Chlorophyll-letale und der sub-microscopische Formwechsel der Plastiden // Exp. Cell. Res. – 1957. – V. 12. – P. 427.

Надійшла до редакції
14.02.2007 р.

PECULIARITIES OF REACTIONS OF THE MOSS *DREPANOCCLADUS ADUNCUS* (HEDW.) WARNST. TO HEAVY METALS ACTION

O. I. Shcherbachenko, O. T. Demkiv

*Institute of Ecology of the Carpathians
National Academy of Sciences of Ukraine
(Lviv, Ukraine)*

Morphological parameters, chlorophylls' content, state of peroxide oxidation of lipids (POL) of chloroplast membranes and activity of main enzymes of antioxidative of system (AOS) defense in the shoots of hygrophytic moss *D. aduncus* have been analyzed an during lead and cadmium action. The changes have been observed, manifesting in minimizing of growth processes, in chlorophylls' content decrease, in elevation of POL level and activity of main en enzymes of AOS. The conclusion has been drawn that such peculiarities of morphological and functional response reactions to heavy metals action reflect processes of tolerant strategy of adaptation accompanied, however.

Key words: *Drepanocladus aduncus*, lead, cadmium, growth processes, peroxide oxidation of lipids, enzymes of antioxidative of system, tolerance

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ МХА *DREPANOCCLADUS ADUNCUS* (HEDW.) WARNST. НА ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

О.И. Щербаченко, О.Т. Демкив

*Институт экологии Карпат
Национальной академии наук Украины
(Львов, Украина)*

Проанализированы морфологические параметры гаметофоров, содержание хлорофиллов, интенсивность пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и активность основных ферментов антиоксидантной системы (АОС) у гигрофитного мха *Drepanocladus aduncus* (Hedw.) Warnst. при действии ионов свинца и кадмия. Установлены изменения, которые проявлялись в ингибировании роста, снижении содержания хлорофиллов, повышении интенсивности ПОЛ и активности основных ферментов АОС. Сделан вывод, что особенности морфофизиологических реакций *D. aduncus* на действие тяжелых металлов отображают процессы толерантной стратегии адаптации.

Ключевые слова: *Drepanocladus aduncus*, свинец, кадмий, ростовые процессы, хлорофиллы, пероксидное окисление липидов, ферменты антиоксидантной системы, толерантность