

Оксана БАЇК

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ТА БІОХЕМІЧНІ ЗМІНИ В ГАМЕТОФІТІ МОХУ ПІД ДІЄЮ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

*Проаналізовано морфологічні та біохемічні зміни моху *Amblystegium serpens* під впливом різних концентрацій свинцю та ртуті. Сублетальні концентрації цих металів спричинювали здебільшого кількісні зміни спектрів кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм естерази. Встановлено, що зразки моху з різних за забрудненістю місць вирощання відрізнялися за вмістом поглинутого свинцю у гаметофорах. Пояснюється це тим, що на забруднених територіях могли вижити стійкіші до впливу важких металів рослини, які були відібрані із загальної маси популяції природним добором. Показано протекторну дію температури щодо токсичного впливу важких металів на досліджуваний мох. Можна припустити, що важливу роль у нормалізації зміненого під дією свинцю та ртуті ізозимного електрофоретичного спектра естерази відігравали білки теплового шоку.*

Нині в доквіллі спостерігається значне зростання рівня важких металів, серед яких ртуть і свинець визнано одними з найсильніших забруднювачів біосфери [4, 7]. Згідно із сучасними уявленнями захист рослин від токсичної дії важких металів здійснюється регуляцією поглинання й акумуляції як на рівні цілого організму, органів, тканин, так і детоксикацією металу на внутрішньоклітинному рівні [9, 13]. Мохи, як і інші вищі рослини, виробили певні адаптивні реакції щодо впливу екстремальних факторів і реалізують їх за допомогою морфологічних, біохемічних і генетичних механізмів.

Адаптивні реакції рослин на дію екстремальних факторів природного середовища мають універсальний характер, реалізуючись через комплекс генетичних, молекулярно-біохемічних і фізіологічних реакцій. Включення того чи іншого механізму адаптації або їх комплексу визначається величиною і тривалістю стресового навантаження на рослини. Генетичні системи рослин, відповідальні за їхню толерантність до екстремальних факторів, включаються за більш тривалих впливів через механізми репресії і дигресії структурних генів, які контролюють синтез ізоenzимів. Вважається, що прояв основних адаптивних реакцій визначається не окремими генами, а всією сукупністю спадкових факторів організму. У процесі адаптації рослин виявляються певні корелятивні зв'язки між змінами морфологічних і біохемічних ознак.

Для розуміння механізмів реалізації адаптивного потенціалу рослин в екстремальних умовах техногенно забрудненого середовища важливо знати онтогенетичну специфіку реалізації інформації генотипу через фенотиповий прояв білків і ферментів. Вияв специфічності генезису ізоензимів в органах рослин залежно від екологічного фону дає змогу оцінити характер, глибину і спрямованість адаптивних змін. Генетично однорідні рослини екологічно чистих і техногенних екоотопів були вдалим об'єктом для порівняльних досліджень реалізації у ході онтогенезу адаптивного потенціалу рослин в умовах забрудненого середовища.

Об'єктом дослідження був мох *Amblystegium serpens* (Hedw.) B.S.G., зібраний у Сколівському районі, Стрийському парку і Шевченківському гаю. Коробочки моху стерилізували протягом двох хвилин розчином 0,1-відсоткової сулеми і старанно промивали стерильною дистильованою водою. Асептично виготовлену однорідну суспензію спор висівали на тверде (1-відсоткового агар-агару) середовище Кнопа, розлите в чашки Петрі. Надалі об'єктом дослідження були дернинки, що утворювалися у стерильних умовах з окремих ізольованих ниток, які регенерували на середовищі Кнопа з окремих стерильних гаметофорів. Для одержання таких дернинок використовували окремі нитки темної гравінегативної регенеративної протонемі, які на світлі інтенсивно галузилися і утворювали бруньки гаметофорів [15]. В усіх випадках рослини вирощували на 16-годинному світловому дні (3000—3500 лк) за температури 18—22°C.

У двомісячних гаметофорів окремих дернинок аналізували електрофоретичний спектр множинних молекулярних форм естерази. Для аналізу гаметофори розділили на три групи: контрольні гаметофори; гаметофори, які перед аналізом обробляли 10^{-3} М розчином HgCl_2 одну хвилину або 10^{-3} М розчином $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ упродовж 18 годин і короткочасно промивали дистильованою водою. Унаслідок такої обробки приблизно половина піддослідних гаметофорів утрачала здатність до регенерації. Третю групу становили гаметофори, які після згаданої обробки металами промивали в дистильованій воді протягом 18 годин.

В окремих дослідках гаметофори, що їх аналізували, перед обробкою розчином $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ витримували протягом двох годин за температури 41°C.

Рослини розтирали в охолоджену до 40°C трис-гліциновому 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). Одержану масу центрифугували при трьох тисячах об/хв. До супернатанту додавали 70-відсотковий розчин сахарози з розрахунку 0,2 мл розчину сахарози на 1 мл екстракту [17]. 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 [12]. Для виявлення естерази застосовували інкубаційне середовище з 5-броміндоксилацетатом [16].

Акумуляцію металу в гаметофорах моху визначали атомно-адсорбційним методом на спектрофотометрі „С—115М1“ (Україна, „Селмі“).

Для оцінювання мінливості популяцій *Amblystegium serpens*, індукованої техногенним забрудненням, досліджено вплив нітрату свинцю у різних концентраціях (10^{-5} - 10^{-3} М) на спектр кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм естерази рослин, зібраних з різних за рівнем забруднення місць (Стрийський парк, Шевченківський гай, Сколівський район).

Важкі метали залежно від концентрації і часу дії можуть не чинити помітного впливу на рослини або викликати стимуляцію їхніх захисних механізмів, чи пошкоджувати їхні клітини і навіть тканини [3]. Із зростанням концентрації $Pb(NO_3)_2$ спостерігалася тенденція послаблення інтенсивності високомолекулярних фракцій кислих розчинних білків з ММ 272 — 132 кД усіх досліджуваних популяцій *Amblystegium serpens*, а у зразках із Сколівського району та Шевченківського гаю посилилися фракції білків із ММ 95 і 66 кД. Натомість зросла інтенсивність низькомолекулярних фракцій білка. Крім того, сублетальні концентрації свинцю індукували появу фракції кислих розчинних білків з ММ 29 кД у рослин з різних місць виростання, а у сколівських зразках, крім того, посилилась інтенсивність фракції з ММ 35 кД. Під впливом 10^{-5} — 10^{-4} М розчину нітрату свинцю послабилася інтенсивність фракцій множинних молекулярних форм естерази з ММ 272, 66 та 45 кД в усіх досліджуваних зразках *Amblystegium serpens*.

Ще відчутнішим виявився вплив сублетальних концентрацій свинцю на спектр множинних молекулярних форм естерази всіх досліджуваних популяцій. Так, у рослин із Стрийського парку і Сколівського району зникли фракції множинних молекулярних форм естерази з ММ 45 і 29 кД. Крім того, у мохових рослин із Сколівського району зникла фракція естерази з ММ 35 кД (рис. 1). Отже, відчутніший вплив свинцю на електрофоретичний спектр кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм естерази виявився у популяції мохів із менш забруднених місць виростання. Можливо, різна токсикотолерантність популяцій *Amblystegium serpens* до важких металів може зумовлюватися як генетичною мінливістю, так і розширенням діапазону норми реакції.

Крім того, досліджувалася здатність популяцій моху *Amblystegium serpens* із згаданих місць виростання акумулювати свинець. Контрольні зразки *Amblystegium serpens* відрізнялися за рівнем вмісту в гаметофорах свинцю, що, очевидно, пов'язано з рівнем забруднення території. Так, вміст свинцю у гаметофорах *Amblystegium serpens* із Сколівського району становив $0,2 \pm 0,01$ мг/кг сухої маси, із Стрийського парку і Шевченківського гаю відповідно: $0,4 \pm 0,03$ та $0,3 \pm 0,07$ мг/кг сухої маси.

Окрім польових, проводили лабораторні дослідження здатності популяцій *Amblystegium serpens* із різних за забрудненістю місць виростання поглинати важкі метали із розчину. Для того дослідні зразки занурювали в 10^{-3} М розчині $Pb(NO_3)_2$ і витримували протягом 18 і 36 годин. Майже 90 відсотків поглинання свинцю із розчину досягалося за 36 год., після чого у відмитих дистильованою водою і висушених зразках визначали вміст акумульованого свинцю атомно-адсорбційним методом. 18-годинне витримування гаметофорів у 10^{-3} М розчині $Pb(NO_3)_2$ спричинило незначне (в 1,2—1,5 раза) підвищення вмісту поглинутого свинцю. 36-годинне витримування у цьому ж розчині свинцю у львівських зразках збільшило його вміст у 2,5 раза, а у зразках із

Сколівського району в 4,2 раза, порівняно з контролем (табл. 1). Відомо, що передобробка проростків ячменю низькими концентраціями свинцю викликала підвищення стійкості і дала їм змогу адаптуватися до дії високих концентрацій металу. Пояснюється це активацією у рослин адаптивних процесів. Під впливом низьких концентрацій важких металів у рослин відбувається активація пристосувально-захисних процесів, унаслідок чого вони можуть переносити без згубних наслідків дію іонів металів у вищих концентраціях [8].

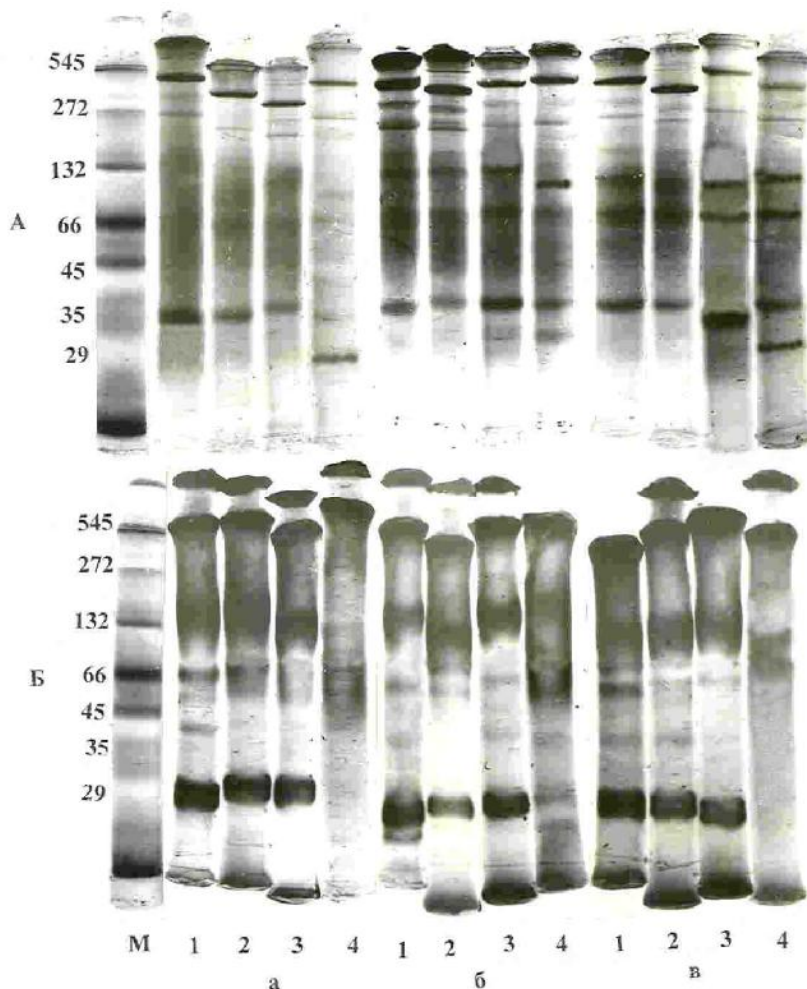


Рис.1. Електрофоретичний спектр кислих розчинних білків (А) і множинних молекулярних форм естерази (Б) популяцій моху *Amblystegium serpens* з різних місць виростання (а, б, в — відповідно із Стрийського парку, Шевченківського гаю та Сколівського району) під впливом різних концентрацій нітрату свинцю: 1 — контроль, 2 — 10^{-5} М, 3 — 10^{-4} М, 4 — 10^{-3} М.

Очевидно, такі процеси трапляються і в нашому випадку в популяції *Amblystegium serpens*. Можна припустити, що на забруднених територіях могли рости тільки рослини, стійкіші до впливу важких металів, які були відібрані із загальної маси природних популяцій добором. Вони вижили й адаптувалися до токсичної дії забруднених місць виростання.

Відомо, що в екстремальних умовах техногенних екотопів відбуваються кількісні та якісні зміни регуляції ферментів, що призводить до змін ізоензимних спектрів. Такі зміни компонентного складу ферментів розглядаються як один із найтонших механізмів адаптації рослин під час стресових впливів різної природи [6]. Ртуть і свинець належать до групи високотоксичних важких металів. Токсичність їх зумовлена передусім здатністю міцно зв'язуватися у живих клітинах з азото- та сірко-реакційними центрами, ураховуючи аміно- та сульфгідрильні групи ферментів [14]. Намагаючись пояснити причини відмінностей у токсичності ртуті та свинцю, можна припустити, що: а) спорідненість аміно- та сульфгідрильних груп окремих ізоензимів естерази для ртуті вища, ніж для свинцю; б) ртуть скоріше, ніж свинець, проникає у клітини гаметофорів, унаслідок чого діюча концентрація ртуті в клітинах досягається скоріше. Позаяк відомо, що на відміну від інших важких металів свинець повільніше проникає у клітини листків.

Таблиця

Вміст $Pb(NO_3)_2$ (мг/кг сухої маси) у природних і експериментальних зразках

Місця зростання зразків <i>Amblystegium serpens</i>	Вміст свинцю (мг/кг сухої маси)		
	У природі	18—годинна дія $10^{-3}M Pb(NO_3)_2$	36—годинна дія $10^{-3}M Pb(NO_3)_2$
Стрийський парк	0,4±0,03	0,48±0,04	1,0±0,08
Шевченківський гай	0,3±0,07	0,36±0,08	0,75±0,18
Сколівський район	0,2±0,01	0,3±0,02	0,84±0,04

Як і у випадку з *Pottia intermedia* [1], хромосомні раси *Amblystegium serpens* (n=20, n=40) обробляли сублетальними концентраціями солей важких металів — $HgCl_2$ та $Pb(NO_3)_2$ самостійно і сумісно із впливом температури. За спектром множинних молекулярних форм естерази хромосомні раси відрізнялися у контролі лише інтенсивністю окремих фракцій. Короткочасна (1хв) дія хлориду ртуті в концентрації $10^{-3} M$ викликала у 20-та 40-хромосомних рас послаблення фракції естерази з ММ 45 кД. Крім того, у 40-хромосомної зникла фракція естерази з ММ 35 кД і послабилася інтенсивність фракції естерази з ММ 29 кД (рис. 2). Нормалізації спектра множинних молекулярних форм естерази 20- та 40-хромосомних рас сприяло попереднє витримування рослин у термостаті протягом двох годин за температури 41 С.

Обробка гаметофорів різних хромосомних рас *Amblystegium serpens* $10^{-3} M$ розчином нітрату свинцю протягом 18 годин спричинила появу фракції естерази з ММ 66 кД у 40-хромосомної раси і послаблення інтенсивності фракцій естерази з ММ 45, 35 та 29 кД обох рас. 36-годинна дія $Pb(NO_3)_2$ зумовила ще й ослаблення усіх високомолекулярних фракцій естерази обох рас (рис. 3). Як і у випадку із впливом ртуті, попередня обробка гаметофорів температурою 41 С призводила до

часткової нормалізації спектра множинних молекулярних форм естерази обох рас *Amblystegium serpens*, що може свідчити про протекторну дію температури щодо впливу важких металів.

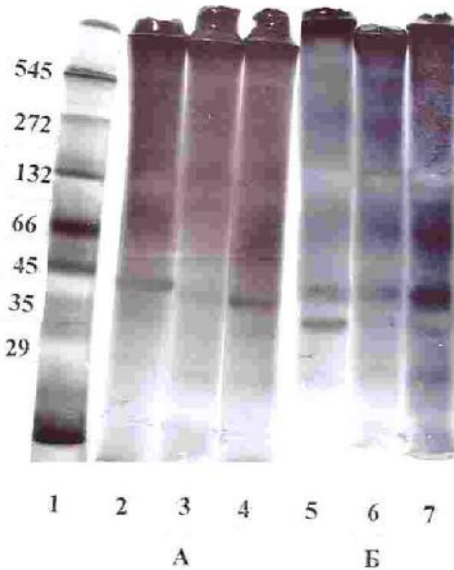


Рис. 2. Зміна електрофоретичного спектра естерази під впливом іонів Hg^{2+} 20- та 40-хромосомних рас *Amblystegium serpens* B.S.G. (відповідно А, Б): 1 — маркер, 2 і 5 — контроль, 3 і 6 — однохвилинна дія Hg^{2+} , 4 і 7 — однохвилинна дія Hg^{2+} з передобробкою температурою 41 С.

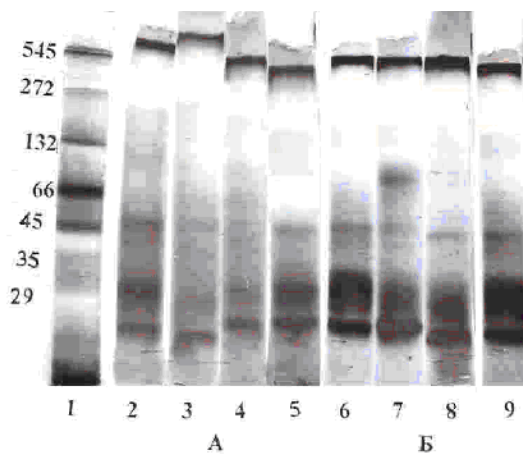


Рис. 3. Зміна електрофоретичного спектра естерази під впливом іоні Pb^{2+} 20- та 40-хромосомних рас *Amblystegium serpens* B.S.G. (відповідно А, Б): 1 — маркер, 2 і 6 — контроль, 3 і 7 — 18-годинна дія Pb^{2+} , 4 і 8 — 36-годинна дія Pb^{2+} , 5 і 9 — 36-годинна дія Pb^{2+} з передобробкою температурою 41°C.

Отже, хромосомні раси *Amblystegium serpens*, які зазнавали дії теплового шоку, виявляли підвищену стійкість до високих концентрацій свинцю та ртуті. За літературними даними [10], рослини, що зазнавали дії теплового шоку, виявляли підвищену стійкість до летальних концентрацій важких металів. Під впливом теплового шоку відбувалася нормалізація спектрів множинних молекулярних форм естерази, модифікованих дією свинцю та ртуті на гаметофори моху.

На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що раси різної плоідности по-різному реагували на токсичну дію поллютантів. Можна припустити, що важливу роль у нормалізації зміненого під дією свинцю та ртуті ізозимного електрофоретичного спектра естерази відіграли білки теплового шоку. Очевидно, що в мохів, як і квіткових рослин [8], еволюційно виробилися схожі механізми виходу із стресової ситуації. Отже, включення альтернативних шляхів метаболізму, зміна структури ферментів сприяють виживанню рослин за дії важких металів. Усі ці механізми взаємно доповнюють один одного залежно від виду рослини, умов вирощування, металу та його концентрації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баїк О. Л., Рінецький Р. Т. Вплив короткочасної дії ртуті (Hg^{2+}) та свинцю (Pb^{2+}) на спектр множинних молекулярних форм естерази гаметофіта моху // Укр. ботан. журн. 2003. — № 2. — Т. 60. — С. 197—202.
2. Гуральчук Ж. З. Механізми устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культурных растений. 1994. — № 2. — Т. 26. — С. 107—118.
3. Коршиков І. І. Стійкість і адаптація деревних рослин до дії поллютантів. — К., — 2001. — С. 48—52.
4. Косик О. І. Токсичний вплив важких металів на рослинний організм // Матеріали ІІ Всеукраїнської конференції студентів та аспірантів „Біологічні дослідження молодих вчених на Україні“. — 2001. — Вып. 1. — С. 23—24.
5. Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л. Генетична активність важких металів в евкаріотичних клітинах // Біополімери і клітина. — 2001. — № 1. — Т. 17. — С. 5—19.
6. Сарсенбаев К. Н. Ферменты и адаптация растений к резкоконтинентальному климату. Автореф. дис. д-ра биол. наук. — Душанбе, 1988. — 44 с.
7. Скопечька О. В., Косик О. І., Мусієнко М. М. Комплексний еколого-фізіологічний аналіз міграції та нагромадження свинцю в агроecosистемах // Физиология и биохимия культурных растений. — 2004. — № 1. — Т. 36. — С. 27—35.
8. Таланова В. В., Титов А. Ф., Ботева Н. П. Влияние свинца и кадмия на проростки ячменя // Физиология и биохимия культурных растений. — 2001. — 33. — № 1. — С. 33—37.
9. Тарабрин В. П., Пельтихина Р. И. Адаптивные механизмы растений к избыточному содержанию металлов // Интродукция и акклиматизация растений. 1985. — Вып. 3. — С. 53—60.
10. Феник С. И., Трофимьяк Т. Б., Блюм Я. Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Усп. соврем. биол. 1995. — 115, — № 3. — С. 261—275.

11. *Carlson R. W., Bazzaz F. A., Sturell J. J., Wedding J. B.* Physiological effects with reentrainment and rainwash of Pb aerosol particulate deposited on plantleaves // *Environ. Sci. and Technol.* Vol. 10, — № 12. — P. 1139—1142.
12. *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. — № 1. — P. 265—275.
13. *Peterson P. J.* Adaptation to toxic metals // *Metals and micronutrients: Uptake and utilization by plants* / Ed. D. A. Robb, W. S. Pierpoint. — New York: Acad. Press, 1983. — P. 51—69.
14. *Richardson D. H. S.* The biology of mosses // Blackwell scientific publication. — Oxford; London; Edinburgh; Boston, 1981. — 220 p.
15. *Ripetskyj R. T., Kit N. A., Chaban C. I.* Gravity effects on the growth and development of moss secondary protonemata // *Adv. Space Res. Cospar.* 1998. — Vol. 21, — № 8/9. — P. 1135—1139.
16. *Rothe G.* Unterschiede im Enzymmuster von Protonema, Moospflanzsche, Sporogon und Kallus der Laubmooskrouzung *Funaria hygrometrica x Physcomitrium piriforme* // *Beitr. Biol. Pflanz.* 1972. — Vol. 48. — № 3. — S. 433—444.
17. *Taylor I. E. P., Schofield W. B., Elliot A. M.* Analysis of moss dehydrogenases by polyacrylamide disc electrophoresis // *Can. J. Bot.* 1970. — Vol. 48. — P. 367—369.

SUMMARY

Oksana BAIK

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN THE MOSS GAMETHOPHYTES UNDER THE ACTION OF HEAVY METALS

Morphological and biochemical changes under the action of different concentrations of lead and mercury have been analysed in the moss *Amblystegium serpens*. Sublethal concentrations of these metals mainly caused quantitative changes in spectra of acid proteins and of esterase multiple molecular forms. It has been established that moss samples from places of different levels of pollution differed in the amount of lead absorbed in gametophores. It is explained by that in polluted territories may survive and be selected plants more resistant to heavy metals action. Temperature has been found in the moss studied as protective to the toxic action of heavy metals. This suggests that important role in normalization of esterase isozyme spectrum changed by lead and mercury action may play proteins of thermal shock.