

## Вплив іонів свинцю на ріст і окислювальний стрес гаметофіту *Funaria hygrometrica* Hedw. на різних стадіях розвитку

НАТАЛІЯ ЯРОСЛАВІВНА КИЯК

Кияк Н.Я., 2012: Вплив іонів свинцю на ріст і окислювальний стрес гаметофіту *Funaria hygrometrica* Hedw. на різних стадіях розвитку. *Чорноморськ. бот. ж.*, Т.8, №2: 171-177.

Досліджували вплив ацетату свинцю на ріст і розвиток гаметофіту моху *F. hygrometrica* та показники окислювального стресу. Встановлено, що токсичний ефект іонів свинцю виявлявся на усіх стадіях розвитку гаметофіту, однак найчутливішим був процес формування бруньок гаметофорів. Виявлено зростання вмісту малонового діальдегіду та карбонільних груп білків залежно від віку гаметофіту *F. hygrometrica*.

*Ключові слова:* свинець, протонема, малоновий діальдегід, карбонільні групи білків, *Funaria hygrometrica*

КYYAK N.YA., 2012: An effect of lead ions on the growth and oxidative stress of *Funaria hygrometrica* Hedw. gametophyte on the different stages of development. *Chornomors'k. bot. z.*, Vol. 8, N2: 171-177.

An effect of lead acetate on growth and development of *F. hygrometrica* gametophyte and indexes of oxidative stress is studied. The toxic effect of lead ions is revealed on all stages of gametophyte development with most sensitivity during gametophore bud formation. Increasing of malonic dialdehyde and carbonylproteins content depending on the age of the moss gametophyte *F. hygrometrica* is established.

*Key words:* lead, protonema, malonic dialdehyde, carbonylproteins, *Funaria hygrometrica*

Кияк Н.Я., 2012: Влияние ионов свинца на рост и окислительный стресс гаметофита *Funaria hygrometrica* Hedw. на разных стадиях развития. *Черноморск. бот. ж.*, Т.8, №2: 171-177.

Исследовали влияние ацетата свинца на рост и развитие гаметофита мха *F. hygrometrica*, а также показатели окислительного стресса. Установлено, что токсический эффект ионов свинца проявлялся на всех стадиях развития гаметофита, однако наиболее чувствительным был процесс формирования почек гаметофоров. Вывявлено повышение количества малонового диальдегида и карбонильных групп белков в зависимости от возраста гаметофита мха *F. hygrometrica*.

*Ключевые слова:* свинец, протонема, малоновый диальдегид, карбонильные группы белков, *Funaria hygrometrica*

Мохоподібні завдяки специфічності мінерального живлення, короткому життєвому циклу, достатній вивченості їх основних фізіологічних реакцій і простоті культивування є зручними об'єктами біотестування забруднення повітря, води та ґрунту. Вивчення впливу полютантів на фізіолого-біохімічні процеси мохів важливе ще й у зв'язку з їх різною екологічною приуроченістю та використанням як біоіндикаторів забруднення атмосферного та водного середовищ [GRODZINSKA, SZAREK-LUKASHEVSKA, 2001]. Мох *Funaria hygrometrica* Hedw. найчастіше є модельним об'єктом, який чутливо реагує на несприятливі зміни середовища, що дає змогу вивчати вплив стресових факторів на різних стадіях розвитку гаметофіту: від проростання одноклітинної спори і

формування одновимірної нитчастої протонеми до дорослої рослини – тривимірного гаметофіту, морфологічно диференційованого на стебло та листки.

Із комплексу неспецифічних реакцій рослин на дію різноманітних стресових факторів важливе значення має активація молекулярного кисню та розвиток окислювального стресу в рослинних клітинах. Ступінь розвитку стресу значною мірою визначається силою та тривалістю дії стресового фактора, чутливістю рослин і стадією їх розвитку [PANDA et al., 2003; ТАРАН та ін., 2004].

Нами досліджено вплив ацетату свинцю на ростові процеси та показники окислювального стресу (малоновий діальдегід і карбонільні групи білків) на різних стадіях розвитку гаметофіту моху *Funaria hygrometrica* Hedw.

### Матеріали та методи дослідження

У дослідах використовували стерильну лабораторну культуру моху *F. hygrometrica*, вирощеного зі спор в контрольованих умовах освітлення (2500–3000 лк), температури (20–22°C) та вологості (85–90%). Досліджували вплив ацетату свинцю у концентраціях 1,0–100,0 мкмоль/л на стадії хлоронеми (7-денна культура), каулонеми (16-денна культура) та гаметофорів (3-місячна культура). Оскільки токсичність солей металів зумовлюють катіони, а кислотні залишки сполук суттєво не впливають на специфіку дії іонів [ДОВГАЛЮК и др., 2001], контролю для залишку оцтової кислоти ми не ставили. Розміри клітин, протонеми та каулонеми вимірювали на моторизованому мікроскопі “Axio Imager M1” та “Jenaval”.

Для визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) рослинний матеріал гомогенізували у 20 % розчині трихлороцтової кислоти та інкубували з 0,5 % розчином тіобарбітурової кислоти на киплячій водяній бані протягом 30 хв. У супернатанті, отриманому після центрифугування, спектрофотометрично визначали вміст МДА при довжині хвилі 532 нм та виражали в нМ МДА на 1 г сирової маси [МУСИЕНКО и др., 2001].

Для визначення вмісту карбонільних груп (КГ) білків наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0). Отриманий після центрифугування (10 хв, 5000 g) осад розчиняли у 10 мМ розчині 2,4-динітрофенілгідразину та інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі. Суміш центрифугували в попередньому режимі, а отриманий осад розчиняли в 6 М гуанідингідрохлориді. Вміст КГ білків визначали у супернатантах спектрофотометрично при довжині хвилі 370 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 22000 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> [ЛУЦАК та ін., 2004]. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [BREDFORD, 1976].

Усі досліди проводили у 3-кратній повторності. Отримані дані опрацьовували методами статистичного аналізу [ПЛОХИНСКИЙ, 1970].

### Результати досліджень та їх обговорення

Гальмування ростових процесів є одним із перших симптомів інтоксикації рослинного організму. Аналіз впливу ацетату свинцю на розвиток протонеми *F. hygrometrica* свідчить, що вид чутливо реагує на наявність важкого металу в субстраті, оскільки вже у концентрації 1,0 мкмоль/л свинець суттєво впливав і на проростання спор, і швидкість росту протонеми (табл. 1). Під впливом 100,0 мкмоль/л ацетату свинцю проростання спор затримувалося майже на добу і втричі знижувався відсоток пророслих спор порівняно з контролем. Концентрації солі свинцю понад 100,0 мкмоль/л повністю гальмували проростання спор моху.

Підвищення концентрації металу в субстраті також інгібувало приріст протонеми. Різниця між варіантами була суттєвою вже на 4 добу після посіву і поступово зростала з віком протонемних дернинок. Аналіз розмірів 7-добової протонеми свідчить про сповільнення швидкості росту під впливом 100,0 мкмоль/л

$Pb(CH_3COO)_2$  майже в 2 рази порівняно з контролем.

Таблиця 1

Вплив ацетату свинцю на ростові показники моху *F. hygrometrica*

Table 1

An effect of lead acetate on growth parameters of the moss *F. hygrometrica*

Концентрація ацетату свинцю, мкмоль/л	Проростання спор, %	Довжина протонеми, мкм	Довжина клітин протонеми, мкм	Ширина клітин протонеми, мкм	Діаметр каулономної дернини, мм	Кількість бруньок гаметофорів, шт.
Контроль	99,1±1,5	1112±43	104,0±9,3	11,0±0,1	5,3±0,2	53,2±0,2
1,0	93,7±2,4	972±25	80,4±9,3	12,2±0,1	3,5±0,09	30,1±0,6
10,0	43,5±4,1	854±31	72,0±7,3	15,2±0,2	2,2±0,02	15,7±0,2
100,0	27,3±2,9	582±8	25,0±2,9	15,9±0,2	1,7±0,05	6,3±0,2

Зміна ростових параметрів протонеми може бути безпосередньо пов'язана як зі зменшенням розмірів клітин, так і з сповільненням темпу мітотичних поділів. Оцтовокислий свинець у концентрації 10,0 мкмоль/л інгібував ріст клітин протонеми, що призводило до зменшення їх довжини в 1,5 рази, а збільшення концентрації свинцю до 100,0 мкмоль/л подвоювало цю різницю (табл. 1). Одночасно із зменшенням довжини збільшувалася ширина клітин, що свідчить про певну зміну ростових процесів й переорієнтацію росту. Відомо, що іони важких металів можуть індукувати різні аномалії протонемних клітин. Так, наприклад у моху *Timmiella anomala* під впливом іонів алюмінію та цинку клітини протонеми набували сферичної форми. Іони ртуті, як й іони свинцю у наших дослідках, призводили до вкорочення і потовщення протонемних клітин. У той же час в присутності іонів нікелю дернинки формувалися витягнутими протонемними столонами, які слабо галузилися і зрідка утворювали бруньки гаметофорів [КАPUR, СНОPRA, 1989].

У контролі темп поділів апікальних клітин протонеми *F. hygrometrica* становить ~8 годин (рис. 1). Із збільшенням концентрації іонів свинцю в субстраті спостерігалось сповільнення мітозів і зменшення довжини премітотичних клітин. Найчіткіше така тенденція проявлялася під впливом сублетальної для *F. hygrometrica* концентрації оцтовокислого свинцю – 100,0 мкмоль/л. У цьому випадку розмір премітотичних клітин зменшувався у 2,5-3 рази, а темп поділу клітин сповільнювався майже вдвічі.

В процесі росту хлоронемні нитки, поступово змінюючись морфологічно й фізіологічно, на 8–10 день розвитку переходили в стадію каулонеми й формували радіально симетричні дернинки. Як і для хлоронеми, на цій стадії пригнічення росту каулономних дернинок відбувалося пропорційно з підвищенням вмісту оцтовокислого свинцю у субстраті. На середовищі з 100,0 мкмоль/л  $Pb(CH_3COO)_2$  діаметр дернинок зменшувався майже втричі порівняно з контролем (табл. 1). Крім того, відбувався хлороз каулономних ниток через інгібуючий вплив ацетату свинцю на синтез хлорофілів [SLUKA, 1983].

Окрім росту, досліджували також вплив іонів свинцю на диференціацію та морфогенетичні процеси – закладання бруньок і розвиток листкостеблових пагонів. Відомо, що іони важких металів (кобальту, кадмію, алюмінію, нікелю, цинку, міді та марганцю) збільшують тривалість процесу брунькоутворення, зменшують кількість бруньок та суттєво гальмують ріст гаметофорів мохів [GLIME, 2007].

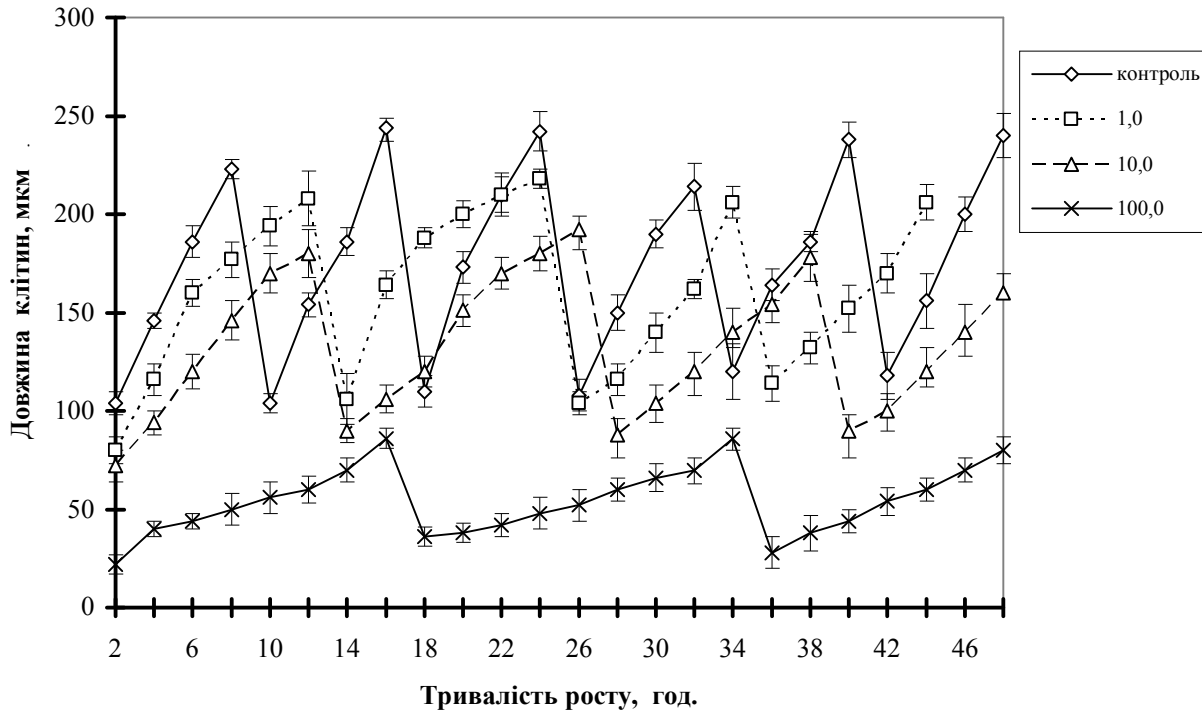


Рис. 1. Вплив ацетату свинцю на темп мітотичних поділів апікальних клітин протонеми моху *F. hygrometrica*. Контроль – середовище без металу, 1,0 – 100,0 – концентрації ацетату свинцю, мкмоль/л.

Fig. 1. An effect of lead acetate on the rate of mitosis of apical cells of *F. hygrometrica* moss protonema. Control – metal free media, 1,0 – 100,0 – lead acetate concentrations, μmol/l.

Оцтовокислий свинець сповільнював закладання бруньок гаметофорів і впливав на їх розвиток. Під впливом 10,0 мкмоль/л солі свинцю формування бруньок гаметофорів затримувалося на 2–3 дні, однак у подальшому вони розвивалися нормально. На середовищі із вмістом оцтовокислого свинцю 100,0 мкмоль/л сповільнювався не лише час появи бруньок, але й їх розвиток аж до поступового відмирання.

Таким чином, токсичний ефект іонів свинцю проявлявся на усіх стадіях розвитку гаметофіту моху *F. hygrometrica* через те, що під впливом важких металів насамперед блокуються ті ланки метаболізму, які пов'язані з активним ростом. Найчутливішою в онтогенезі *F. hygrometrica* була стадія формування бруньок та розвитку гаметофорів. Ці результати підтверджені даними спостереження у природних умовах, де під впливом важких металів у деяких видів мохів у першу чергу відбувалося пригнічення генеративного розмноження і переключення на вегетативне [SHAW, 1990; BATES, FARMER, 1992].

Негативний вплив іонів свинцю на рослинний організм, як правило, пов'язаний не лише з інгібуванням росту, але й ініціюванням окислювального стресу у клітинах [PANDA et al., 2003; CHOUDHURY, PANDA, 2004]. Пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ) є критичним для цілісності функціонування клітини та її компартментів, оскільки відбувається переважно в мембранах. У наших дослідках на усіх трьох стадіях розвитку гаметофіту *F. hygrometrica* (хлоронеми, каулонеми та гаметофорів) встановлено суттєве зростання вмісту МДА залежно від концентрації важкого металу у субстраті (рис. 2, А). Крім того, існує кореляція між вмістом МДА та віком рослин. Якщо оцінити вміст МДА на різних стадіях розвитку гаметофіту, то слід відзначити, що його концентрація зростає у 2,5 рази у каулонемі та майже в 5 разів у гаметофорах порівняно з хлороневою. Така тенденція властива як для зразків, що росли на різних концентраціях важкого металу, так

і для контролю. Літературні дані свідчать про активацію ПОЛ під впливом іонів міді, свинцю і кадмію [GARCIA et al., 1999] та наростання цього процесу на етапі старіння органів і тканин рослин [DHINDSA, MATOWE, 1981].

Модифікації АФК піддаються не тільки ліпіди, але й білки, причому окислені білки практично не відновлюються [DEAN et al., 1991]. Первинні кисневі радикали взаємодіють із залишками амінокислот білків, які модифікуються, утворюючи кето- та альдопохідні різного характеру, а також інші продукти. Як свідчать результати досліджень, існує позитивна кореляція між процесами окисної модифікації білків і ліпідів [Климишин та ін., 2007]. У таких модифікованих білках змінюється функціональна активність, вони деградуються протеолітичними ферментами і разом з тим є джерелом вільних радикалів. Використаний нами метод дослідження окисної модифікації білків базується на взаємодії 2,4-динітрофенілгідразину з альдегідними і кетонними групами у бічних ланцюгах амінокислот. Як показник окисної модифікації білків використали вміст карбонільних груп білків [ЛУЩАК та ін., 2004].

Як встановлено, свинець індукував підвищення вмісту КГ білків на усіх стадіях розвитку гаметофіту. Відзначено також залежність процесу від концентрації ацетату свинцю. Оцтовокислий свинець у концентрації 100,0 мкмоль/л індукував збільшення вмісту КГ білків у хлоронемі більше, ніж у 2 рази (рис. 2, Б).

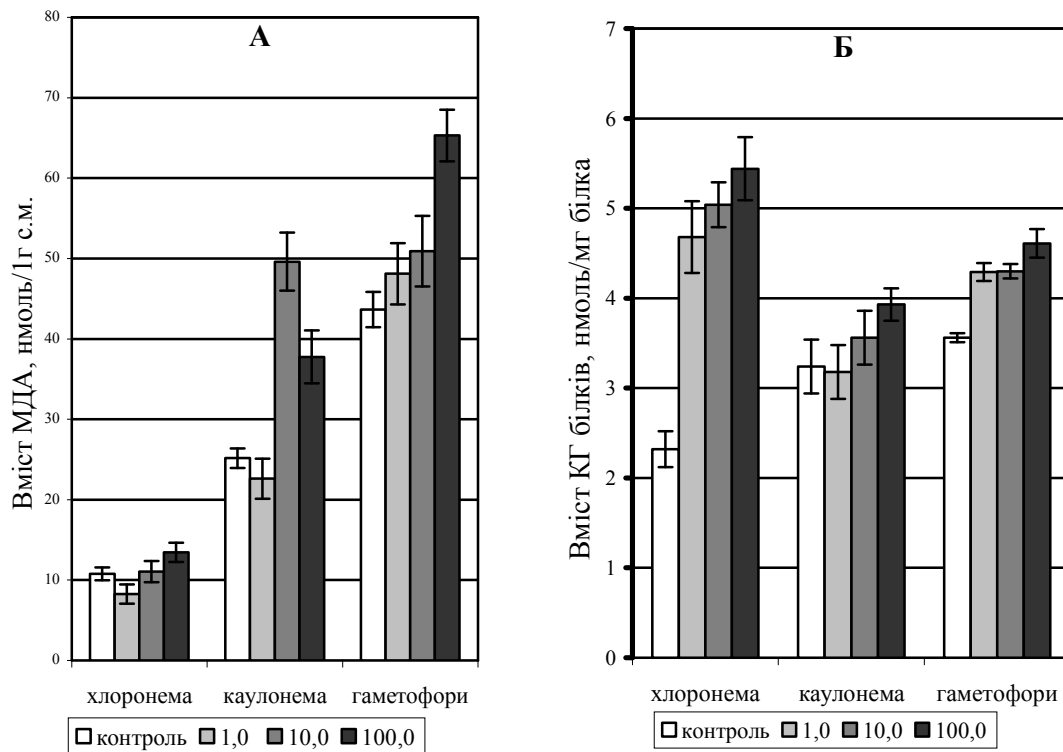


Рис. 2. Вплив ацетату свинцю у концентрації 1,0–100,0 мкмоль/л на вміст: А – маленового диальдегіду; Б – КГ білків на різних стадіях розвитку гаметофіту моху *F. hygrometrica*.

Fig. 2. An effect of lead acetate concentration 1,0–100,0 μmol/l on the content: A – malonic dialdehyde; B – carbonylproteins during the different age stages of *F. hygrometrica* moss gametophyte.

У каулонемі та гаметофорах зростання вмісту КГ білків було дещо нижчим, ніж у хлоронемі. На цих стадіях розвитку гаметофіту під впливом сублетальної концентрації металу встановлено підвищення вмісту КГ білків в 1,2–1,4 рази, порівняно з контролем. Крім того, істотно підвищувалася кількість КГ білків у рослинах контролю на стадії каулонемі та гаметофорів порівняно з хлороневою, що, очевидно, можна пояснити віковими змінами в рослинних клітинах [STADTMAN, BERLETT, 1999].

Таким чином, толерантність мохів значною мірою визначається силою та тривалістю дії стресового фактора та стадією розвитку гаметофіту. Показано, що процеси ліпопероксидації та окисної модифікації білків на різних стадіях розвитку гаметофіту *F. hygrometrica* (хлоронеми, каулонеми і пагонів) взаємопов'язані та є важливими показниками впливу іонів свинцю на рослинний організм. Встановлено, що залежно від віку гаметофіту моху в клітинах каулонеми та гаметофорів відбувається посилення процесів вільнорадикального окислення. Очевидно, в умовах тривалого впливу ацетату свинцю гіперактивація метаболізму та надмірні енергетичні затрати набагато швидше виснажили адаптивний потенціал рослин *F. hygrometrica*, в результаті чого показники окислювального стресу – вміст малонового діальдегіду і карбонільних груп білків – зросли.

### Висновки

Токсичний ефект іонів свинцю проявлявся на усіх стадіях розвитку гаметофіту моху *F. hygrometrica*, однак найчутливішим етапом в онтогенезі *F. hygrometrica* був процес формування бруньок та розвитку пагонів.

Показники окислювального стресу – вміст малонового діальдегіду та карбонільних груп білків на різних стадіях розвитку гаметофіту *F. hygrometrica* – є важливими індикаторами впливу іонів важкого металу на рослинний організм.

З віком у рослин спостерігалася суттєва активація вільнорадикального окислення, свідченням чого є зростання основних показників окислювального стресу, що, очевидно, зумовлено й процесами старіння гаметофорів *F. hygrometrica*.

Перебіг окислювального стресу в несприятливих умовах неоднозначний, й у кожному конкретному випадку необхідно враховувати і рівень стресового впливу, і стадію розвитку організму.

### Список літератури

- ДОВГАЛЮК А. И., КАЛИНЯК Т. Б., БЛЮМ Я. Б. Оценка фито- и цитотоксической активности солей металлов с помощью корневой апикальной меристемы лука // Цитология и генетика. – 2001. – № 1. – С. 3-9.
- КЛИМИШИН Н., СТАРИКОВИЧ Л., КЛЕВЕТА Г. та ін. Окиснювальна модифікація ліпідів і білків за дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2007. – № 45. – С. 63-70.
- ЛУЩАК В. І., БАГНЮКОВА Т. В., ЛУЩАК О. В. Показники окислювального стресу. 1. Тіобарбітуратактивні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 71, № 5. – С. 112-117.
- МУСИЄНКО М. М., ПАРШИКОВА Т. В., СЛАВНЫЙ П. С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений. – К.: Фитосоциоцентр, 2001. – 200 с.
- ПЛОХИНСКИЙ Н. А. Биометрия. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
- ТАРАН Н. Ю., ОКАНЕНКО Л. М., БАЦМАНОВА Л. М., МУСИЄНКО М. М. Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 3-14.
- BATES J. W., FARMER A. M. Bryophytes and Lichens in a Changing Environment. – Oxford: Clarendon Press, 1992. – 404 p.
- BREDFORD W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – N 72. – P. 248-252.
- CHOUDHURY S., PANDA S. K. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity // Current Science. – 2004. – Vol. 87, N 3. – P. 342-346.
- DEAN R. T., HUNT J. V., GRANT A. J. et al. Free radicals damage in proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins // Free Radical Biol. Med. – 1991. – N 11. – P. 161-168.
- DHINDSA R.S., MATOWE W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation // J. Exp. Bot. – 1981. – Vol. 32, N 26. – P. 79-91.
- GARCIA A., BAQUEDANO F.J., NAVARRO P., CASTILLO F.J. Oxidative stress induced by copper in sunflower plants // Free Rad. Res. – 1999. – N 31. – P. 51-57.
- GLIME G.M. Bryophyte ecology // 2007. – http:// [www.bryoecol.mtu.edu](http://www.bryoecol.mtu.edu).
- GRODZINSKA K., SZAREK-LUKASHEVSKA G. Response of mosses to the heavy metal deposition in Poland – an overview // Environ. Pollut. – 2001. – Vol. 114, N 3. – P. 443-451.

- HOFFMAN G. R. Ecological studies of *Funaria hygrometrica* (L.) Hedw. in eastern Washington and northern Idaho // Ecol. Monogr. – 1966. – N 36. – P. 157-180.
- КАПУР А., ЧОПРА R. N. Effects of some metal ions on protonemal growth and bud formation in the moss *Timmia anomala* grown in aseptic cultures // J. Hattori Bot. Lab. – 1989. – N 66. – P. 283-298.
- PANDA S. K., CHAUDHURY I. and KHAN M. H. Heavy metal induced lipid peroxidation affects antioxidants in wheat leaves // Biol. Plant. – 2003. – N 46. – P. 289-294.
- SHAW J. Metal tolerance in Bryophytes / Metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. – New York, 1990. – P. 133-152.
- SLUKA Z. A. The dependence of the chlorophyll content and the leaf-area of mosses on the ecological conditions // Vest. Mosk. Univ. Ser. XVI Biol. – 1983. – Vol. 37, N 3. – P. 24-29.
- STADTMAN E. R., BERLETT B. S. Reactive Oxygen Species in Biological Systems / Eds. D. I. Gilbert, P. Colton. – New York: Kluwer Academic, 1999. – P. 657-675.

Рекомендує до друку  
А.П. Орлюк

Отримано 30.12.2011 р.

Адреса автора:

Н. Я. Кияк  
Інститут екології Карпат  
НАН України  
вул. Стефаника, 11  
м. Львів, 79000  
Україна  
e-mail: [morphogenesis@mail.lviv.ua](mailto:morphogenesis@mail.lviv.ua)

Author's address:

N. Ya. Kyiak  
Institute of Ecology of the Carpathians  
National Academy of Sciences of Ukraine  
Stefanyka Str., 11  
Lviv 79000  
Ukraine  
e-mail: [morphogenesis@mail.lviv.ua](mailto:morphogenesis@mail.lviv.ua)