

УДК 582.32.575.17

О.Л. Баїк

МІНЛИВІСТЬ МОХУ *AMBLYSTEGIUM SERPENS* (HEDW.) SCHIMP. З РІЗНИХ ЕКОТОПІВ

Баїк О.Л. Изменчивость мха *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. из различных экотопов // Науч. зап. Гос. природоведч. музея. – Львов, 2009. – Вып. 25. – С. 149-154.

Электрофоретически показано более существенные изменения спектра кислых растворимых белков и множественных молекулярных форм эстеразы под влиянием свинца у популяций *A. serpens* из с. Дубина.

Экспериментально доказано, что изменения экспрессии генов под влиянием тяжелых металлов непосредственно зависят от уровня пloidности. Кроме того, установленная взаимосвязь между активностью ядерно-зависимого синтеза и стойкостью к токсическому влиянию тяжелых металлов может свидетельствовать о протекторной роли термического шока.

Baik O.L. Variability of the moss *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. from different ecotopes // Proc. of the State Nat. Hist. Museum. – Lviv, 2009. – 25. – P. 149-154.

We showed considerable changes of electrophoretical spectra of acid soluble proteins and multiple molecular forms of esterase under the influence of lead in populations of *A. serpens* from v. Dubyna.

It has been experimentally established, that changes of gene expression under the influence of heavy metals directly depend on ploidy level. Moreover, correlation between activity of nuclear-dependent synthesis and stability to toxic action of heavy metals can indicate the protective role of thermal shock.

У ході еволюції мохи виробили певний адаптивний потенціал щодо впливу екстремальних факторів довкілля і реалізують його за допомогою морфо-фізіологічних, біохімічних і генетичних механізмів залежно від ступеня і часу дії фактора. Еволюція адаптивних змін у вищих рослин пов'язана з необхідністю забезпечення максимального пристосування і збереження здатності змінюватися відповідно до умов середовища. Підвищену стійкість рослин до важких металів пов'язують з утворенням нових форм і різновидностей рослин індивідуальніших до підвищених концентрацій важких металів в природному середовищі, ніж рослини фонових популяцій. Механізми металостійкості рослин можуть реалізуватися внаслідок затримки поглинання важких металів рослинами, формування бар'єрів, що запобігають активному їх транспорту до органів рослин, іммобілізації важких металів і переведення їх у неактивні форми, а також посилення захисних метаболічних процесів до дії поллютантів [2, 6]. Як зазначає Д. Шов [9], підвищена стійкість до цинку і міді популяцій *Funaria hygrometrica*, що зростають на ґрунтах з високим вмістом цих металів, порівняно з фоновими популяціями, може бути зумовлена природним відбором генотипів, що мають підвищену здатність до синтезу фітохелатинів. Адаптація рослин до впливу поллютантів можлива, очевидно, лише у вузькому діапазоні концентрацій та за певних умов довкілля. Всі адаптивні перебудови метаболізму рослин пов'язані з реакцією на зміну факторів зовнішнього середовища.

Для оцінки мінливості популяції *Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp., індукованої техногенним забрудненням, досліджувався вплив хлориду ртуті та нітрату свинцю у різних концентраціях (10^{-5} – 10^{-3} М) на спектр кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм естерази мохів, зібраних з різних екоотопів та можливу роль температурного стресу у його нормалізації.

Матеріал і методика досліджень

Коробочки *A. serpens*, зібрані у с. Дубина Сколівського району Львівської області (НПП «Сколівські Бескиди» (дубовий ліс) – 20- та 40-хромосомні раси, м. Львові: Стрийському парку (поблизу автотраси) та Шевченківському гаю (мішаний ліс), стерилізували протягом 2 хв. розчином 0,1%-ної сулеми і старанно промивали стерильною дистильованою водою. Асептично виготовлену однорідну суспензію спор висівали на агаризоване середовище Кноп П. 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 розділяли на три групи: контроль; гаметофори, які перед аналізом обробляли 10^{-3} М розчином HgCl_2 1 хв. або 10^{-3} М розчином $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 18 год. і короткочасно промивали дистильованою водою. У результаті такої обробки приблизно половина піддослідних гаметофорів втрачала здатність до регенерації. Третю групу становили гаметофори, що оброблялись металами впродовж 36 год. Окремо аналізували гаметофори, які витримували протягом 2 год. за температури 41°C перед обробкою розчинами солей металів. Рослини розтирали в охолодженому до 4°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 3 тис. об/хв. До супернатанту додавали 70% розчин сахарози з розрахунку 0,2 мл розчину сахарози на 1 мл екстракту [10]. 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 [7]. Для виявлення естерази застосовували інкубаційне середовище з 5-броміндоксилацетатом [8].

Результати досліджень та їх обговорення

Важкі метали залежно від концентрації та часу дії можуть пошкоджувати клітини та тканини рослин, не здійснювати помітного впливу або ж навіть стимулювати їх захисні механізми [3, 4]. Із зростанням концентрації $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ спостерігалась тенденція послаблення інтенсивності високомолекулярних фракцій кислих розчинних білків (ММ 272 – 132 кД) усіх досліджуваних популяцій *A. serpens*, а у зразках із с. Дубина та Шевченківського гаю посилились фракції білків із ММ 95 і 66 кД. Натомість зростала інтенсивність низькомолекулярних фракцій білка. Крім того, сублетальні концентрації свинцю індукували появу фракції кислих розчинних білків з ММ 29 кД у рослин з різних місцевиростань, а у сколівських зразках посилилась ще інтенсивність фракції з ММ 35 кД. Під впливом 10^{-5} – 10^{-4} М розчину нітрату свинцю послабилась інтенсивність фракцій множинних молекулярних форм естерази з ММ

272, 66 та 45 кД в усіх досліджуваних зразках *A. serpens*. Ще відчутнішим виявився вплив сублетальної (10^{-3} М) концентрації $Pb(NO_3)_2$ на спектр множинних молекулярних форм естерази всіх досліджуваних популяцій. Так, у рослин із Стрийського парку та с. Дубина зникли фракції множинних молекулярних форм естерази з ММ 45 і 29 кД. Крім того, у мохів з с. Дубина відсутня фракція естерази з ММ 35 кД, наявна у контролі (рис. 1). Отже, істотніший вплив свинцю на електрофоретичний спектр кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм естерази виявився у моху, зібраного в с. Дубина.

Відомо, що передобробка проростків ячменю низькими концентраціями свинцю зумовлювала підвищення стійкості до подальшої дії високих концентрацій металу. Пояснюється це активацією у рослин адаптивних процесів [5]. Очевидно, що такі процеси мають місце у випадку зразків *A. serpens* з різних екотонів. Можливо, різна токсикотолерантність моху *A. serpens* з різних місцевиростань до важких металів може зумовлюватися генетичною мінливістю.

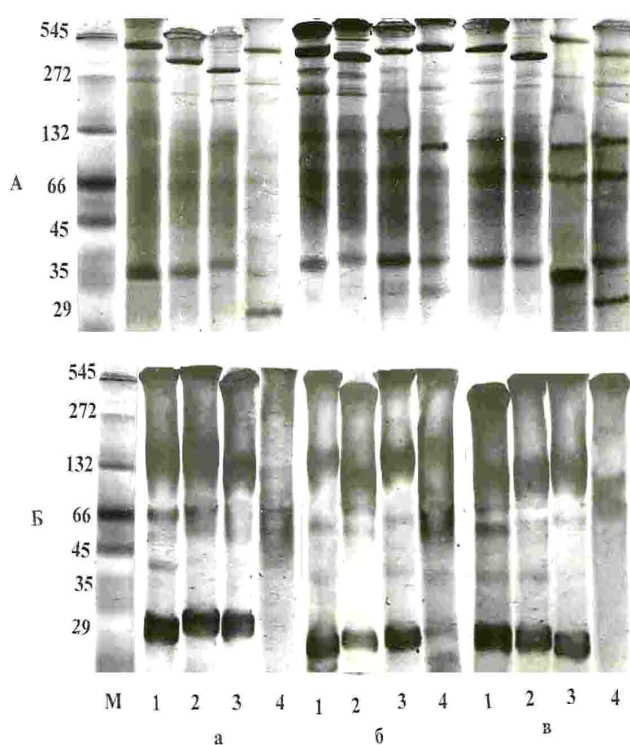


Рис. 1. Електрофоретичний спектр кислих розчинних білків (А) і множинних молекулярних форм естерази (Б) популяцій моху *Amblystegium serpens* з різних місцевиростань (а, б, в – відповідно із Стрийського парку, Шевченківського гаю та с. Дубина) під впливом різних концентрацій нітрату свинцю: 1 – контроль,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

Для дослідження мінливості *A. serpens* аналізували вплив нітрату свинцю на електрофоретичний спектр множинних молекулярних форм естерази 20- та 40-хромосомних рас. Як показали проведені експерименти з *A. serpens*, як і у випадку з *Pottia intermedia* (Turn.) Fürn. [1], важливу роль у нормалізації зміненого під дією солей ртуті та свинцю спектра множинних молекулярних форм естерази відіграють білки теплового шоку. За спектром множинних молекулярних форм естерази хромосомні раси амблістегіума повзучого відрізнялися у контролі лише інтенсивністю окремих фракцій. Короткочасна (1хв.) дія хлориду ртуті у концентрації 10^{-3} М спричинила у 20- та 40-хромосомних рас послаблення фракції естерази з ММ 45 кД. Крім цього, у 40-хромосомної раси зникла фракція естерази з ММ 35 кД і послабилась інтенсивність фракції естерази з ММ 29 кД. (рис. 2). Нормалізації спектра множинних молекулярних форм естерази 20- та 40-хромосомних рас сприяло попередня витримування рослин у термостаті протягом 2 год. за температури 41°C . Так, у 20-хромосомної раси відновилась фракція естерази з ММ 45 кД, а у 40-хромосомної раси – фракції з ММ 35 та 29 кД.

18-годинна обробка гаметофорів різних хромосомних рас *A. serpens* 10^{-3} М розчином нітрату свинцю спричинила появу фракції естерази з М 66 кД у 40-хромосомної раси і послаблення фракцій естерази з ММ 45, 35 та 29 кД обох рас. 36-годинна дія $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ зумовила ще й послаблення всіх високомолекулярних фракцій

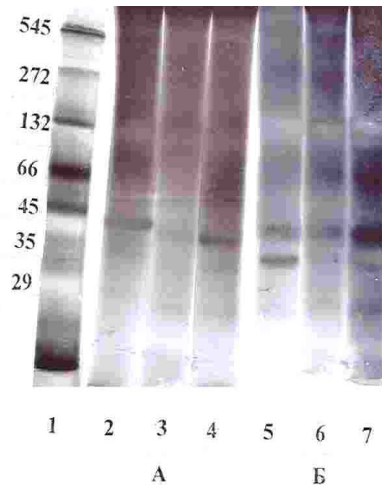


Рис. 2. Зміна електрофоретичного спектра естерази під впливом іонів Hg^{2+} 20- та 40-хромосомних рас *Amblystegium serpens* B.S.G. (відповідно А, Б): 1 – маркер, 2 і 5 – контроль, 3 і 6 – однохвилинна дія Hg^{2+} , 4 і 7 – однохвилинна дія Hg^{2+} з передобробкою температурою 41°C .

естерази обох рас (рис. 3). Як і у випадку з ртуттю, тепловий шок призводив до часткової нормалізації спектра множинних молекулярних форм естерази обох рас *A. serpens*, що може свідчити про протекторну дію температури щодо впливу важких металів. Отже, гаметофори *A. serpens*, які піддавалися тепловому шоку, виявляли

підвищену стійкість до високих концентрацій свинцю і ртуті. Під впливом теплового шоку відбувалась нормалізація спектрів множинних молекулярних форм естерази, модифікованих дією свинцю та ртуті на гаметофори мохів.

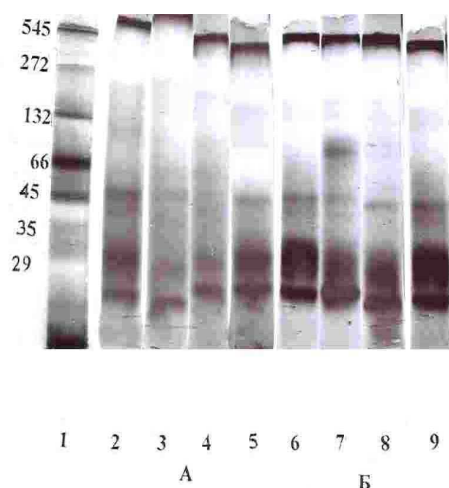


Рис. 3. Зміна електрофоретичного спектра естерази під впливом іонів Pb^{2+} 20- та 40-хромосомних рас *Amblystegium serpens* (відповідно А, Б): 1 – маркер, 2 і 6 – контроль, 3 і 7 – 18-годинна дія Pb^{2+} , 4 і 8 – 36-годинна дія Pb^{2+} , 5 і 9 – 36-годинна дія Pb^{2+} з передобробкою температурою $41^{\circ}C$.

Висновки

На підставі проведених досліджень показано, що відчутніший вплив свинцю на електрофоретичний спектр кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм естерази виявився у популяції моху із с. Дубина. Очевидно, мохи із міських екотонів є стійкішими до дії полютантів. Можливо, це може бути обумовлено генетичною пластичністю.

Рослини, що піддавались тепловому шоку, виявляли підвищену стійкість до летальних концентрацій важких металів. Можна припускати, що важливу роль у нормалізації зміненого під дією свинцю та ртуті ізозимного електрофоретичного спектра естерази відіграли білки теплового шоку.

1. Байк О.Л., Ріпецький Р.Т. Вплив короточасної дії ртуті (Hg^{2+}) та свинцю (Pb^{2+}) на спектр множинних молекулярних форм естерази гаметофіту моху // Укр. ботан. журн. – 2003. – **60**, № 2. – С. 197-202.
2. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Кордюм Е.Л. – К.: Наук. думка, 2003. – 277 с.
3. Коршиков И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – К.: Наук. думка, 1996. – 237 с.

4. Коршиков І.І. Стійкість і адаптація деревних рослин до дії поллютантів // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліття. – К.: НАН України, 2001. – С. 48-52.
5. 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.
6. 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.
7. Lowry O.A., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-275.
8. Rothe G. Unterschiede im Enzymmuster von Protonema, Moospflänsche, Sporogon und Kallus der Laubmooskrouzung *Funaria hygrometrica* x *Physcomitrium piriforme* // Beitr. Biol. Pflanz. – 1972. – **48**, № 3. – S. 433-444.
9. Shaw A.J. Genetic variation for tolerance to copper and zinc within and among populations of the moss *Funaria hygrometrica* // New Phytologist. – 1988. – **109**. – P. 211-222.
10. Taylor I.E.P., Schofield W.B., Elliot A.M. Analysis of moss dehydrogenases by polyacrylamide disc electrophoresis // Can. J. Bot. – 1970. – **48**. – P. 367-369.

Інститут екології Карпат НАН України, Львів
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua