

УДК 582.32:54.06

Н.Я. Кияк

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЕПІФІТНОГО МОХУ *LESKEA POLYCARPA* HEDW. ЗАЛЕЖНО ВІД АТМОСФЕРНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

*Кияк Н.Я. Особенности функционирования антиоксидантной системы эпифитного мха *Leskea polycarpa* Hedw. в зависимости от атмосферного загрязнения // Науч. зап. Гос. природоведч. музея. – Львов, 2009. – Вып. 25. – С. 137-142.*

В опытах использовали образцы эпифитного мха *Leskea polycarpa* из разных по уровню атмосферного загрязнения тяжелыми металлами экотопов г. Львова. Определено содержание тяжелых металлов (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn и Fe) в растительном материале. Установлена взаимосвязь между накоплением металлов в растениях и интенсивностью люминесценции хлорофилла. В растительных образцах из загрязненных экотопов выявлено повышенное использование восстановленной формы глутатиона и, в соответствии с этим, возрастание активности ферментов глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, что свидетельствует о важной роли антиоксидантной системы в условиях стресса.

*Kyjak N.Ya. Peculiarities of functioning of antioxidant systems of epiphytic moss *Leskea polycarpa* Hedw. according to atmospheric pollution // Proc. of the State Nat. Hist. Museum. – Lviv, 2009. – 25. – P. 137-142.*

Samples of epiphytic moss *Leskea polycarpa* from the localities in Lviv, which differ by the level of air pollution, were used in the experiments. The level of accumulation of heavy metals (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn and Fe) in the plant material was established. The correlation between heavy metal accumulation and intensity of chlorophyll luminescence was indicated. The activity of the basic components of glutathione-dependent antioxidative system was appreciated. The reduction of the contents of reduced glutathione and increase of activity of enzymes glutathione peroxidase and glutathione reductase in moss samples from contaminated ecotopes were established, which testify to important role of antioxidant systems in stress conditions.

У рослин промислових зон протягом їхнього існування виробився певний адаптивний потенціал до впливу антропогенних чинників, котрий реалізується за допомогою фізіолого-біохімічних, морфо-анатомічних та популяційних механізмів. Мохи є одним із важливих компонентів урбанізованих екотопів завдяки високій толерантності, а також широкому спектру резистентних форм. Специфіка їх анатомо-морфологічної структури та здатність поглинати й акумулювати іони важких металів високої концентрації стали передумовою для використання цих рослин як біоіндикаторів забруднення атмосферного та водного середовищ, і як модельних об'єктів для дослідження морфо-фізіологічних і геномних змін, спричинених дією важких металів [8, 20].

Відомо, що важкі метали індують у рослинних клітинах активацію пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), що виявляється у порушенні донорно-акцепторних взаємозв'язків, підвищенні активності утворення вільних радикалів та перекисних сполучень, пошкодженні ліпідно-білкових взаємодій у мембранах [2, 18]. Розвиток таких деструктивних процесів блокується компонентами захисної антиоксидантної системи, які інактивують продукти окислення або запобігають їх

утворенню. Це, насамперед, ферментативні реакції, що забезпечують деградацію токсичних субстратів за участю ферментів пероксидази, каталази, супероксиддисмутази, аскорбатоксидази, глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази та системи низькомолекулярних антиоксидантів (аскорбінова кислота, глутатіон), сприяючи антиоксидантному захисту в онтогенезі рослин [13, 19].

Функціонування захисних антиоксидантних систем в умовах впливу важких металів досить докладно вивчене в квіткових рослин, і значно слабше – у мохів [11, 12]. Тому метою роботи було дослідження активності компонентів глутатіон-залежної антиоксидантної системи епіфітного моху *Leskea polycarpa* Hedw., зібраного із різних за рівнем забруднення важкими металами місцевиростань на території м. Львова та природного заповідника „Розточчя”.

Матеріал і методика досліджень

Об'єктом дослідження був широко розповсюджений епіфітний вид мохів *Leskea polycarpa*. Зразки цього моху збирали у м. Львові з різних місцевиростань: вул. Стрийська (5 м від дороги); парк ім. І. Франка (3 м від дороги); парк ім. Б. Хмельницького; регіональний ландшафтний парк (РЛП) „Знесіння”. Зразки із природного заповідника „Розточчя” використовували як контроль.

Для аналізів використовували свіжозібраний рослинний матеріал. Вміст важких металів (Cu, Pb, Cd, Zn, Mn та Fe) визначали атомно-адсорбційним методом [6].

Цитофотометричне визначення інтенсивності свічення хлорофілу проводили на цитофлуориметрі ЛЮОМ-РЗ з використанням цитофотометричної приставки з інтерференційним світлофільтром 685 ± 14 нм; збудження люмінесценції індукували синьо-фіолетовим світлом ртутної лампи надвисокого тиску ДРШ-250 [4].

Активність компонентів глутатіонзалежної антиоксидантної системи визначали за стандартними методиками. Вміст відновленого глутатіону та активність глутатіонредуктази визначали за Р. Смітом [21], активність глутатіонпероксидази оцінювали за В.М. Моїном [7]. Білок у ферментному препараті визначали за В. Бредфордом [10]. Статистичне опрацювання отриманих даних проводили із застосуванням пакету прикладних програм „Excel”.

Результати досліджень та їх обговорення

Екотопи, у яких збирали рослинний матеріал, виявилися досить контрастними за рівнем атмосферного забруднення важкими металами, оскільки зразки *L. polycarpa* істотно відрізнялися за вмістом важких металів (таблиця). Концентрації свинцю та кадмію у зразках із вул. Стрийської та парку ім. І. Франка були майже в 3 рази вищими, ніж у рослинному матеріалі зі „Знесіння” та „Розточчя”. Аналогічні співвідношення встановлені й для іонів цинку, марганцю та заліза. Відмінності щодо акумуляції іонів міді у рослинах були ще контрастнішими – у зразках із парку ім. І. Франка та вул. Стрийської відмічено зростання вмісту іонів металу в 6 разів, порівняно з рослинами із „Розточчя”.

Особливої уваги заслуговують питання ранньої діагностики пошкодження рослин атмосферними поллютантами. Відомо, що вміст хлорофілу використовується багатьма

дослідниками для біоіндикації стану забруднення навколишнього середовища як окремими токсикантами, так і їх комплексами [1].

Таблиця

Вміст важких металів у зразках моху *L. polycarpa* із різних місцевиростань

Місце виростання	Вміст важких металів, мкг/г сухої речовини					
	Cu	Pb	Cd	Zn	Mn	Fe
Прир. заповідник „Розточчя”	9,2±0,6	17,4±0,8	0,7±0,02	32,1±0,2	28,9±0,2	1121,1±21
РЛП „Знесіння”	11,0±1,7	22,2±1,5	0,7±0,03	67,8±1,7	35,4±1,8	1203,6±45
Парк ім. Б. Хмельницького	18,5±1,2	26,5±1,8	0,9±0,03	65,8±1,3	41,3±1,5	1536,6±98
Парк ім. І. Франка	57,1±2,5	67,9±3,4	1,8±0,5	169,8±12,3	101,9±7,3	3549,3±153
Вул. Стрийська	56,2±1,6	90,9±0,8	2,5±0,4	202,4±12,3	108,6±5,8	3283,7±105

У наших дослідах іони важких металів зумовили значні зміни у пігментній системі листків *L. polycarpa*. У рослин із вул. Стрийської та парку ім. І. Франка спостерігали появу знебарвлення та руйнування хлорофілу, некроз і відмирання клітин. На одному й тому ж пагоні виявлено листки як з точковими некрозами, так і з некрозами, які охоплювали до 80% листкової пластинки. Необхідно відзначити, що на багатьох листках некротичні плями були локалізовані біля жилки і вздовж крайової зони листків, тобто в тих ділянках листкової пластинки, де найшвидше та найактивніше відбувається поглинання катіонів важких металів. Оскільки одним із показників токсичного впливу важких металів є інтенсивність люмінесценції хлорофілу [5], ми проаналізували її зміни в листках досліджуваних зразків та встановили взаємозв'язок між концентрацією важких металів у рослинах та інтенсивністю люмінесценції хлорофілу (рис. 1). У листках рослин, зібраних із вул. Стрийської, парку ім. І. Франка та ім. Б. Хмельницького інтенсивність люмінесценції була у 1,5-2 рази нижчою, ніж у рослин, зібраних у природному заповіднику „Розточчя”. Ці результати свідчать про значний пошкоджуючий вплив важких металів на пігменти фотосинтезу та підтверджують доцільність використання люмінесценції хлорофілу як тест-реакції на забруднення повітря важкими металами.

Як бачимо, рослини із різних екопотів суттєво відрізняються за вмістом важких металів та їх впливом на пігментну систему листків. Це призвело до зміни активності основних компонентів захисної глутатіон-залежної антиоксидантної системи у зразках *L. polycarpa*. Аналіз вмісту відновленого глутатіону (Г-SH) показав, що зі збільшенням концентрації важких металів у рослинному матеріалі, відбувалося поступове зменшення вмісту відновленої форми глутатіону (рис. 2 а). Особливо чітко це простежувалося у випадку порівняння зразків зі „Знесіння” (216,0±2,2 мкМ НАДФН₂/г с.м.), парку ім. І. Франка (165,3±1,4 мкМ НАДФН₂/г с.м., $t_d=19,6$) та вул. Стрийської (152,1±1,2 мкМ НАДФН₂/г с.м., $t_d=22,8$, за $t_{0,95}=2,8$).

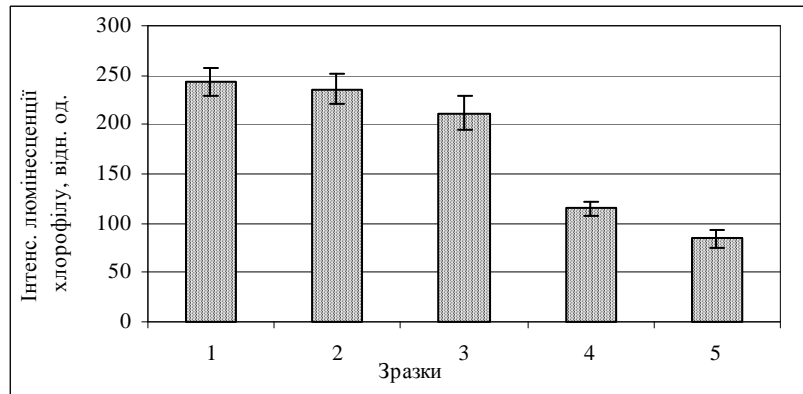


Рис.1. Інтенсивність люмінесценції хлорофілу в клітинах листкової пластинки моху *L. polycarpa* із різних місцевиростань: 1 – природний заповідник „Розточчя”; 2 – регіональний ландшафтний парк „Знесіння”; 3 – парк ім. Б. Хмельницького; 4 – парк ім. І. Франка; 5 – вул. Стрийська.

Істотне зниження Г-SH можна пояснити як поліфункціональністю його дії, так і надмірним використанням в умовах стресу. Г-SH – це попередник фітохелатинів, які зв’язують іони важких металів у клітинах, і субстрат для глутатіон-залежних трансфераз, які каталізують кон’югацію глутатіону з потенційно небезпечними ксенобіотиками (наприклад, гербіцидами) [16]. Крім того, це важливий окисно-відновний буфер клітини, що захищає сульфгідрильні групи ферментів від дії полютантів та забезпечує нормальне їх функціонування в екстремальних умовах [9].

Зниження вмісту відновленого глутатіону простежувалося поряд з істотним зростанням активності глутатіонпероксидази (ГП) – ферменту, субстратом якого є відновлений глутатіон, тому отримані дані певною мірою пояснюють високі витрати відновленої форми глутатіону, яка необхідна для функціонування ГП. У наших дослідженнях активність ферменту підвищувалася зі зростанням вмісту важких металів у рослинному матеріалі (рис. 2 б). Найчіткіше така кореляція простежувалася між зразками, зібраними у регіональному ландшафтному парку „Знесіння” та на вул. Стрийській ($t_4=27,6$, за $t_{0,95}=2,8$). Відомо, що цей фермент виконує протекторну функцію у клітині, беручи участь у редукції цитотоксичних ліпопероксидів, які утворюються внаслідок окислювального стресу [15]. Встановлено, що в рослинних клітинах функціонує 3 типи глутатіонпероксидаз: селензалежна ГП, селеннезалежна ГП та глутатіонтрансфераза, яка виявляє глутатіонпероксидазну активність. Очевидно, у клітинах *L. polycarpa* функціонує селеннезалежна ГП, тоді як селензалежний фермент інгібується внаслідок зв’язування в активному центрі іонів Se^{2+} з іонами Cd^{2+} чи Pb^{2+} [3, 14]. Відновлення пулу Г-SH, який інтенсивно витрачається в умовах стресу, відбувається внаслідок роботи ферментів, які синтезують глутатіон, та ферменту глутатіонредуктази (ГР), що каталізує НАДФН-залежну реакцію відновлення окисленої форми глутатіону [13, 17].

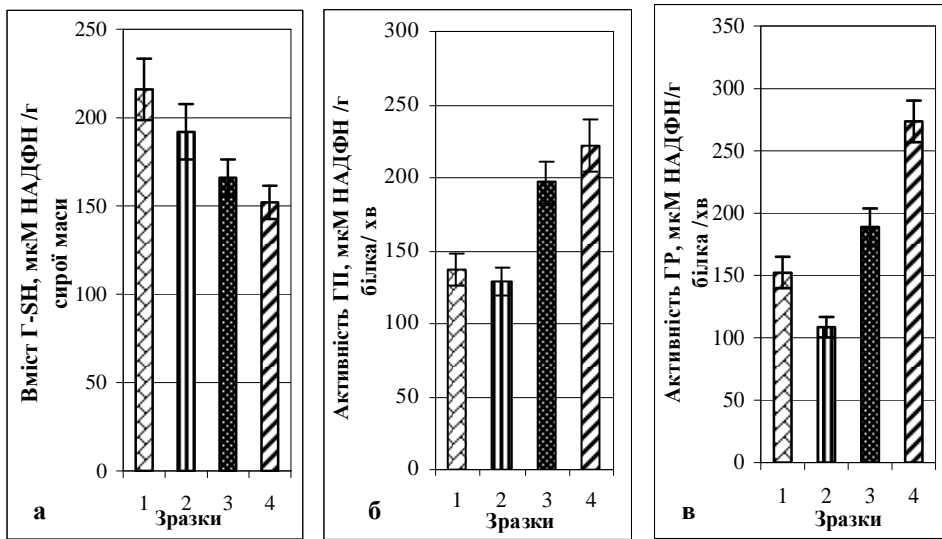


Рис. 2. Вміст відновленого глутатіону (а), активність глутатіонпероксидази (б) та глутатіонредуктази (в) у пагонах *L. polycarpa* із різних місцевиростань: 1 – регіональний ландшафтний парк „Знесіння”; 2 – парк ім. Б. Хмельницького; 3 – парк ім. І. Франка; 4 – вул. Стрийська.

Результати експериментів, наведені на рисунку 2 в, свідчать про те, що активність глутатіонредуктази підтримувалася на досить високому рівні, особливо у тих зразках, які росли на забруднених територіях. Так, активність ГР у рослинах, зібраних у парку ім. І. Франка та поблизу вул. Стрийської зростала у 1,5-2 рази, порівняно зі зразками з регіонального ландшафтного парку „Знесіння”. Тобто, підвищені концентрації іонів важких металів активували процеси відновлення глутатіону в клітинах моху *L. polycarpa*.

Висновки

На підставі результатів наших досліджень встановлено, що глутатіон-залежна антиоксидантна система – одна з основних захисних систем мохів в умовах стресу. Висока функціональна активність її компонентів, яка встановлена у дослідях із епіфітним мохом *L. polycarpa* в умовах підвищення рівня атмосферного забруднення важкими металами, очевидно, є одним із важливих механізмів, які визначають „метаболічний фенотип” цього виду й формують його адаптивний потенціал.

Подяка

Автор висловлює щирю подяку науковому співробітнику Інституту екології Карпат НАН України к.б.н. В.І. Козловському за визначення вмісту важких металів у рослинному матеріалі.

1. Алексеева-Попова Н.В., Игошина А.В., Косицин А.В., Ильинская Н.Л. Устойчивость к тяжелым металлам (Pb, Zn, Cu) отдельных видов и популяций естественных фитоценозов из района медно-колчеданных рудопроявлений // Растения в экстремальных условиях минерального питания. Эколого-физиологические исследования. – Л.: Наука, 1983. – С. 22-42.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи соврем. биол. – 1991. – **11**, № 6. – С. 923-932.
3. Гришко В.Н., Сищіков Д.В. Функціонування глутатіонзалежної антиоксидантної системи рослин при дії фтористого водню // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть: Зб. наук. праць. – Київ, 2001. – Т. 1. – С. 37-41.
4. Демкив О.Т., Сытник К.М. Морфогенез архегониат. – К.: Наук. думка. – 1985. – 204 с.
5. Кравкина И.М. Влияние атмосферных загрязнителей на ультраструктуру листьев // Укр. бот. журн. – 1991. – **76**, № 1. – С. 3-9.
6. Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды металлами. – М.: Гидрометеоиздат, 1981. – 168 с.
7. Моин В.М. Простой и специфический метод для определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. – 1985. – № 12. – С. 724-726.
8. Anthonovich J., Shaw J. Inter- and intraspecific variation of mosses in tolerance to copper and zinc // Evolution. – 1987. – № 6. – P. 1312-1325.
9. Alscher R.G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants // Physiol. Plant. – 1989. – № 77. – P. 457-464.
10. Bredford W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 248-252.
11. Bruns I., Sutter K., Menge S., Neumann D. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes // J. of Plant Physiol. – 2001. – № 158. – P. 79-89.
12. Choudhury S., Panda S.K. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead (Pb) and arsenic (As) phytotoxicity. // Curr. Sci. – 2004a. – № 87. – P. 342-348.
13. 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. – № 100. – P. 241-254.
14. Holland R.I. Cytotoxicity of fluoride // Acta odontol. Scand. – 1980. – № 38. – P. 63-79.
15. Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Haygim G. Plant glutathione peroxidases // Physiol. Plant. – 1997. – № 100. – P. 234-240.
16. May M.J., Leaver C.J. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures // Plant Physiol. – 1993. – № 103. – P. 621-627.
17. May M. J., Vernoux T., Leaver C., van Montagu M. V., Inze D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development // J. Exp. Bot. – 1998. – № 49. – P. 649-667.
18. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant. Sci. – 2002. – № 7. – P. 405-410.
19. Panda S. K., Choudhury I., Khan M. H. Heavy metal induced lipid peroxidation affects antioxidants in wheat leaves // Biol. Plant. – 2003. – № 46. – P. 289-294.
20. Reimann C., Niskavaara H., Kashulina G. et al. Critical remarks on the use of terrestrial moss (*Hylocomnium splendens* and *Pleurozium schreberi*) for monitoring of airborne pollution // Environ. Pollut. – 2001. – **113**, № 1. – P. 41-57.
21. Yenne S.P., Hatzios K. Influence of oxime ether on glutathione content and glutathione-related enzyme activity in seeds and seedlings of grain sorghum // Z. Naturforsch. – 1990. – №45. – P. 96-106.