

УДК УДК 57.04

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ И ПИГМЕНТОВ В ФОРМИРУЮЩИХСЯ ЛИСТЬЯХ *MATTEUCCIA STHRUTHIOPTERIS*

© 2010 О.А. Розенцвет, Е.С. Богданова,¹ О.Н. Макурина²

Показано, что ионы кадмия приводят к снижению уровня хлорофиллов и каротиноидов, а также увеличению количества общих липидов в формирующихся листьях *Matteuccia sthruthiopteris*. Рассматриваются обнаруженные изменения липидного и пигментного состава как компенсаторный механизм поддержания гомеостаза развивающихся листьев *Matteuccia sthruthiopteris*.

Ключевые слова: *Matteuccia sthruthiopteris*, мембранные липиды, улитки, пигменты, тяжелые металлы.

В последние годы усиливается загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) в масштабах, которые несвойственны природе [1]. Адаптация организмов к измененным условиям внешней среды возможна благодаря действию компенсаторных механизмов, связанных с изменением активности и направленности действия метаболических процессов [7].

Кадмий (Cd) является одним из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды из числа ТМ. Это подвижный активный элемент, который, попадая в живые организмы (в растения, животных и человека), способен конкурировать с железом, медью, кальцием и другими металлами [8].

В ряде обзоров обобщены известные данные об аккумуляции и физиологических аспектах толерантности высших растений к действию Cd [6; 11; 12; 22; 24]. В число токсических эффектов, которые Cd оказывает на высшие растения, входит снижение поглощения минеральных элементов; ингибирование активности ферментов, фотосинтеза и дыхания. Многие из этих эффектов связаны с влиянием Cd на мембранный генезис и целостность биологических мембран, что во многом определяется составом липидов как основного структурообразующего компонента [21; 23].

Фотосинтез растений в значительной степени зависит от состава липидов, поскольку пигментно-белковый комплекс фотосинтетического аппарата встроен в матрицу полярных глицеролипидов мембран тилакоидов, состоящих из моно- и дигалактозилдиацилглицеринов (МГДГ, ДГДГ), сульфохинозилдиацилглицеринов

¹Розенцвет Ольга Анатольевна (olgarozen@pochta.ru), Богданова Елена Сергеевна (coralis@mail.ru), Институт экологии Волжского бассейна РАН, 445003, Российская Федерация, г. Тольятти, ул. Комзина, 10.

²Макурина Ольга Николаевна (biochemistry.ssu@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

(СХДГ) и фосфатидилглицеринов (ФГ) [10; 15]. Липиды создают среду для функционирования компонентов фотосистем и регулируют взаимодействие отдельных комплексов [19].

Несмотря на большое количество работ, связанных с влиянием Cd на рост, фотосинтез, состав липидов, работ по возрастным изменениям в составе липидов в растениях, испытывающих воздействие ТМ, включая Cd, явно недостаточно.

Целью наших исследований было изучение динамики состава липидов и пигментов в листьях папоротника *Matteuccia thurthiopteris* (L.) Todaro (страусника обыкновенного), формирующихся в присутствии ионов Cd. Данный вид является представителем древнейшей группы сосудистых растений. Он широко распространен в лесных фитоценозах средней полосы России. Отметим, что современные папоротники представляют огромный интерес в изучении стратегии выживания растительных организмов, поскольку обладают достаточно простыми и эффективными приспособительными реакциями к условиям окружающей среды [13].

Материалы и методы исследования

Растительный материал. Папоротники *M. thurthiopteris* (Polypodiophyta) собирали в мае 2009 г. на одном из участков Жигулевского заповедника им. И.И. Спрыгина в районе с. Бахилово Самарской области, когда растения находились в состоянии органического покоя.

Инкубация. Растения отмывали от почвы в проточной воде и осушали фильтровальной бумагой. После взвешивания образцы помещали в отдельные сосуды с питательной средой Кнопа (соотношение веса корневища/водная среда 1:4). После одних суток адаптации к новым условиям в питательную среду однократно добавляли Cd(NO₃)₂ в концентрации 100 мкМ. Выбор концентрации сделан согласно предварительным исследованиям, показавшим наиболее значимые изменения роста [4]. Растения инкубировали в условиях освещения 1400 ± 200 лк при 15-часовом световом дне и температуре 20 °С в течение 1–10 суток. Для биохимических анализов использовали ткани фотосинтезирующих органов: улитки и верхние и средние сегменты взрослых листьев.

Экстракция и анализ пигментов. Содержание хлорофиллов "a" и "b" определяли спектрофотометрическим методом на Specol (Чехия) в ацетоновой вытяжке и рассчитывали по формулам [17].

Экстракция и анализ липидов. Выделение липидов проводили по методу [9]. Разделение гликолипидов (ГЛ) проводили методом одномерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках (10×10 см) с закрепленным слоем силикагеля с использованием системы растворителей: ацетон:бензол:вода (91:30:8). Проявляли ГЛ опрыскиванием пластинок 5 % 12MoO₃ × H₃PO₄ в метаноле и последующим нагреванием их при температуре 150 °С в течение 10 мин. Количество ГЛ определяли денситометрически (Кейтс, 1975).

Разделение фосфолипидов проводили методом двумерной ТСХ на стеклянных пластинках (6×6 см) с закрепленным слоем силикагеля с использованием систем растворителей: хлороформ:метанол:бензол:аммиак (130:60:20:12) — первое направление; хлороформ:метанол:бензол:ацетон:уксусная кислота (140:60:20:10:8) — второе направление. Проявляли фосфолипиды (ФЛ) опрыскиванием пластинок 10 % H₂SO₄ в метаноле с последующим нагреванием их при температуре 180 °С в течение 15 мин. Количество фосфатидилглицерола (ФГ) определяли по содержанию неорганического фосфора [25].

Анализ жирных кислот. Для анализа жирных кислот (ЖК) использовали их метиловые эфиры, которые получали путем кипячения в 5 % HCl в метаноле. Полученные эфиры очищали препаративной ТСХ и анализировали на газожидкостном хроматографе "Хроматэк Кристалл 5000.1" (Россия) с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0,25 мм "RESTEK" (США). Температура колонки — 180 °С, испарителя и детектора — 260 °С. Скорость тока газа-носителя (гелий) — 20 мл/мин.

Статистика. Данные обрабатывали статистически. Значения в таблицах и рисунках представляют средние арифметические из всех опытов и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение

M. sthruthiopteris относится к столонообразующим видам папоротников, имеет короткий вертикальный ствол, на верхушке которого располагается крупная почка [3]. Листья папоротников на ранней стадии развития улиткообразно закручены (улитки) и нарастают верхушкой.

Согласно предварительным исследованиям, более 80 % поглощенного растением Cd задерживалась корневой системой, а меньшая часть металла проникала в клетки корня и транспортировалась в листья. В молодых, улиткообразно закрученных листьях (улитках) содержание кадмия составило 1,3 мкг/г сухого веса, а в тканях развернувшихся листьев — 3,2 мкг/г (средняя часть) и 4,1 мкг/г (верхняя часть листьев) [5].

Многочисленные исследования показали, что фотосинтетический аппарат растений очень чувствителен к повышенному содержанию металлов в среде. Это связано, в первую очередь, с их негативным влиянием на фотосинтетические пигменты [16]. В наших экспериментах содержание зеленых пигментов в листьях контрольных вариантов заметно различалось в зависимости от стадии развития листьев (см. таблицу). Максимальное количество хлорофиллов "a" и "b" отмечено в средней части листьев и составило 0,88 мг/г и 0,23 мг/г сырой массы соответственно. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях папоротника в присутствии Cd в питательном субстрате снижалось, однако степень его влияния на содержание пигментов зависела от стадии развития листьев. Так, в тканях улиток и тканях средних частей листьев количество хлорофилла "a" снижалось в среднем на 40 %, а в верхних частях — только на 10 %. Содержание хлорофилла "b" в тканях улиток оказалось более чувствительным к действию ионов кадмия по сравнению с хлорофиллом "a" (его уровень снижался на 60 %). В других сегментах листьев содержание хлорофилла "b" снижалось в той же степени, что и содержание хлорофилла "a". Отмечено также снижение уровня каротиноидов в улитках и срединных частях листьев в 1,6–2,4 раза, а в верхних частях — в 1,2 раза в сравнении с контролем.

Отношение хлорофиллов "a/b" является одним из показателей нормального хода фотосинтетических реакций листьев. У всех образцов папоротника под влиянием Cd соотношение между хлорофиллами "a" и "b" не менялось. Известно, что хлорофилл "a" входит в состав реакционных центров и периферических антенных комплексов фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II), в то время как хлорофилл "b" преимущественно является компонентом светособирающего комплекса ФС II [18]. Постоянство данного отношения указывает на то, что, несмотря на снижение общего количества пигментов, которое происходит под влиянием ионов Cd,

Таблица
Динамика содержания пигментов (мг/г сырой массы) в листьях
M. sthruthiopteris, формирующихся в присутствии ионов Cd

Листья	Пигменты					
	Хлоро- филл <i>a</i>	Хлоро- филл <i>b</i>	Соотно- шение хлоро- филлы <i>a/b</i>	ССК	Кароти- ноиды	Соотн. хлоро- филлы <i>a+b</i> /каро- тиноиды
Улитки						
Контроль	0,27±0,01	0,09±0,06	3,0	1,20±0,00	0,11±0,10	3,3
Cd	0,16±0,01	0,04±0,09	3,7	1,00±0,40	0,07±0,04	2,8
Верхние листья						
Контроль	0,73±0,05	0,16±0,01	4,5	1,20±0,00	0,07±0,02	12,7
Cd	0,66±0,10	0,14±0,04	4,5	1,10±0,40	0,06±0,02	13,3
Средние листья						
Контроль	0,88±0,10	0,23±0,03	3,8	1,20±0,00	0,08±0,01	13,8
Cd	0,53±0,10	0,15±0,02	3,5	1,20±0,00	0,05±0,01	16,9

соотношение между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающих комплексов оставалось неизменным.

Возможными причинами снижения содержания зеленых пигментов в растениях является непосредственное действие ТМ на активность ферментов биосинтеза хлорофилла. При этом основными мишенями ингибирования выступают образование фотоактивного хлорофиллидредуктазного комплекса и синтез δ -аминолевулиновой кислоты [20]. Известно, что Cd так же, как Cu и Zn, может нарушать биосинтез хлорофилла, взаимодействуя с SH-группами белков, в результате чего снижается активность протохлорофиллидоксиоредуктазы [6].

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что в листьях, формирующихся в присутствии Cd, происходило увеличение содержания всех липидов, отвечающих за структуру мембран хлоропластов. Так, в контроле по мере формирования листьев наблюдалось увеличение доли МГДГ в составе гликолипидов с 45 % (улитки) до 67 % (средние части листьев). Под действием Cd концентрация и относительный вклад МГДГ в состав липидов листьев снижался: в липидах верхних листьев с 63 до 57 %, а в липидах средних листьев — с 67 до 55 % по сравнению с контрольными вариантами. При этом увеличивалось относительное содержание двух других компонентов ДГДГ и СХДГ, особенно ярко выраженное для СХДГ: его вклад в состав ГЛ взрослых листьев увеличивался более чем в 5 раз.

Стабилизация тилакоидных мембран зависит также и от величины отношения МГДГ/ДГДГ. Снижение этого показателя может приводить к редукции содержания хлорофилла и фотосинтетической активности, изменяя структуру хлоропластов [15]. Полученные нами данные показывают, что отношение МГДГ/ДГДГ снижается на 8 % в липидах верхних листьев и на 37 % — в липидах средних листьев. Возможно, что одна из причин снижения количества зеленых пигментов была связана с изменением данного соотношения, характеризующего структуру гран в хлоропласте.

Увеличение же количества ГЛ у страусника обыкновенного свидетельствует об интенсификации обмена липидов, направленной, по-видимому, на обеспечение

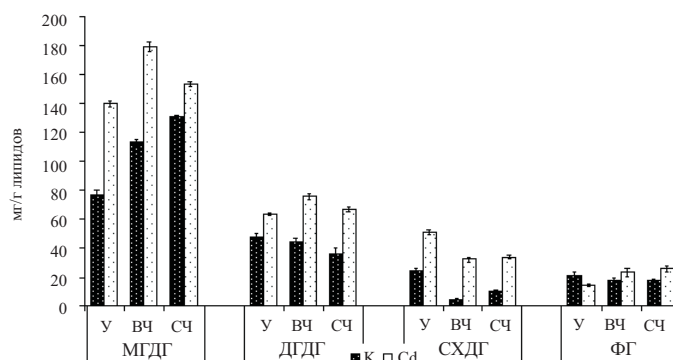


Рис. 1. Состав липидов мембран хлоропластов папоротника *Matteuccia struthiopteris*: У — улитки, ВЧ — верхняя часть листьев, СЧ — средняя часть листьев

оптимальной среды для замены поврежденных в результате воздействия Cd белков. В связи с этим уместно отметить более высокое накопление этих липидов, особенно ДГДГ и СХДГ. Не менее важным является накопление ФГ, поскольку данный липид служит одним из ключевых факторов, стабилизирующих олигомерную форму светособирающего комплекса (ССК) фотосистемы II.

Среди ацильных компонентов общих липидов в листьях папоротника более 80 % от суммы составляли кислоты C_{16} и C_{18} ряда, и влияние Cd в целом мало отразилось на соотношении насыщенных и ненасыщенных кислот (данные не приведены). Однако заметные изменения наблюдались в составе ненасыщенных ЖК. Большая часть ненасыщенных ЖК улиток и средних частей листьев представлена полиеновыми кислотами, главным образом, полиеновыми (рис. 2). В верхних частях листьев больше доля моноеновых кислот, которая превышала количество диеновых кислот. Следует отметить, что Cd практически не привел к изменению ненасыщенности ацильных цепей в липидах растущих частей листа — улиток и верхних сегментах. В отличие от них, в более зрелых частях листа, влияние Cd было более существенным — увеличивалась доля моноеновых, но снижалась доля полиеновых ЖК.

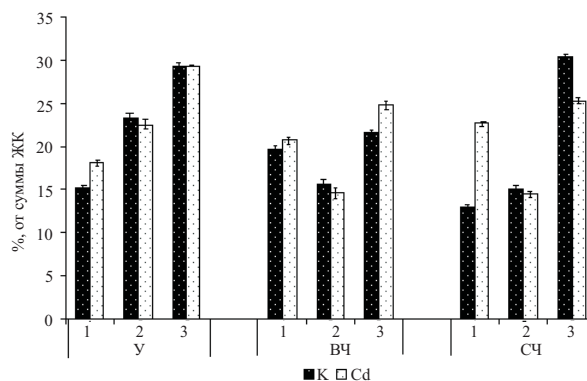


Рис. 2. Содержание ненасыщенных жирных кислот в составе общих липидов *Matteuccia struthiopteris*: 1 — моноеновые кислоты; 2 — диеновые кислоты, 3 — полиеновые

Таким образом, в листьях папоротника *M. sthruthiopteris*, формирование которых происходило в присутствии Cd, отмечено снижение уровня пигментов и каротиноидов. В то же самое время наблюдалось увеличение общего содержания липидов, отвечающих за структуру фотосинтетического аппарата, а также изменение их вклада относительно друг друга, что можно расценивать как компенсаторную реакцию клетки, направленную на стабилизацию фотосинтезирующих комплексов. Интенсификация липидного обмена в клеточных мембранах, направленная на усиленный синтез гликолипидов, обеспечивает защиту от этого металла и поддержание нормального гомеостаза клеток в формирующихся листьях папоротника.

Литература

- [1] Город и биосфера / Л.О. Карпачевский [и др.] // Биосфера. 2009. № 1. С. 153–165.
- [2] Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 323 с.
- [3] Нехлюдова М.В., Филин В.Р. Страусник обыкновенный. Биологическая флора Московской области / под ред. В.Н. Павлова, В.Н. Тихомирова. М.: Изд-во МГУ, 1993. Ч. 1. С. 5–21.
- [4] Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Мурзаева С.В. Изменение состава липидов пресноводного растения *Hydrilla verticillata* (L. fil.) Royle при аккумуляции и элиминации ионов тяжелых металлов. Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 97–106.
- [5] Розенцвет О.А., Богданова Е.С. Влияние ионов кадмия на содержание фотосинтетических пигментов листьев разного возраста папоротника *Matteuccia sthruthiopteris* // Физические механизмы становления и поддержания функции организма: материалы Международной научно-практической конференции. Сухуми, 2010. С. 415–418.
- [6] Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 4. С. 606–630.
- [7] Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 240 с.
- [8] Распределение Cd и Fe в растениях *Mesembryanthemum crystallinum* при адаптации к Cd-стрессу / Н.И. Шевякова [и др.] // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 5. С. 756–763.
- [9] Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification // Canad. J. Biochem. Physiol. 1959. № 37. P. 911–917.
- [10] Benning C. A role for Lipid Trafficking in Chloroplast Biogenesis // Prog. Lipid Res. 2008. V. 47. P. 381–389.
- [11] Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochimie. 2006. V. 88. P. 1707–1719.
- [12] Cobbet C.C. Phytochelatin and their roles in Heavy Metal Detoxication // Plant Physiol. 2006. V. 123. P. 825–832.
- [13] Dyer A.F. The Experimental Biology of Ferns. Edinburgh: Academic Press, 1979. P. 1–10.
- [14] Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxication and tolerance // J. Experiment. Bot. 2002. V. 53. P. 1–11.

- [15] Hölzl G., Dörman P. Structure and Function of Glycerolipids in Plants and Bacteria // *Progr. Lipid Res.* 2007. V. 46. P. 225–243.
- [16] Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: target of in vivo heavy metal chlorophyll formation / H. Küpper [et al.] // *J. Phycology.* 2002. V. 38. P. 429–441.
- [17] Lichtenthaler H.K., Welburn R.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V. 603. P. 591–592.
- [18] Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution / Z. Liu [et al.] // *Nature.* 2004. V. 428. P. 287–292.
- [19] Lipids in Photosystem II: Interactions with Protein and Cofactors / B. Loll // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 509–519.
- [20] Mysliwa-Kurdział B., Strzalka K. Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolarion process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide // *Ag. Ecosys. Environ.* 2004. V. 106. P. 199–207.
- [21] Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves / I. Nouairi [et al.] // *Plant Science.* 2006. V. 170. P. 511–519.
- [22] Cadmium regulated nitrate reductase activity in *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle / U.N. Rai [et al.] // *Water, Air and Soil Pollution.* 1998. V. 106. P. 171–177.
- [23] Rama Devi S., Prasad M.N.V. Membrane lipid alteration in heavy metal exposed plants // Prasad MNV, Hagemeyer J (eds.) *Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems.* Berlin: Springer, 1999. P. 99–117.
- [24] Sanita di Toppi L., Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experiment. Bot.* 1999. V. 41. P. 105–130.
- [25] Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // *J. Chromatogr.* 1975. V. 115. P. 246–249.

Поступила в редакцию 3/VI/2010;
в окончательном варианте — 3/VI/2010.

INFLUENCE OF CADMIUM IONS ON QUALITATIVE
AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF LIPIDS AND
PIGMENTS IN THE FORMING LEAVES OF *MATTEUCCIA*
STHRUTHIOPTERIS

© 2010 O.A. Rozentsvet, E.S. Bogdanova,³ O.N. Makurina⁴

It was shown that cadmium ions lead to decreasing the level of chlorophyll and carotenoids, but also to the increasing the quantity of the general lipids in the forming leaves of *Matteuccia sthruthiopteris*. The found out changes in the structure of lipids and pigments as compensatory mechanism of homeostasis maintenance of developing leaves of *Matteuccia sthruthiopteris* are considered.

Key words: *Matteuccia sthruthiopteris*, membrane lipids, ferns, pigments, heavy metals.

Paper received 3/VI/2010.

Paper accepted 3/VI/2010.

³Rozentsvet Olga Anatolievna (olgarozen@pochta.ru), Bogdanova Elena Sergeevna (coralis@mail.ru), Institute of Ecology of Volga Basin RAS, Togliatti, 445003, Russian Federation.

⁴Makurina Olga Nikolaevna (dekanat.05.54@mail.ru), the Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.