

УДК 581.522:633.13+546.56

М. М. Вакерич, В. І. Ніколайчук, Г. М. Денчиля-Сакаль, Я. С. Гасинець, О. П. Ткач

*Ужгородський національний університет*

### **ПРОТЕКТОРНИЙ ЕФЕКТ ХЛОРИДУ НАТРИЮ ПРИ АДАПТАЦІ РОСЛИН ВІВСА ПОСІВНОГО ДО НАДЛИШКУ СУЛЬФАТУ КУПРУМУ**

Досліджено механізм підвищення толерантності до впливу сульфату купруму шляхом попередньої адаптації до надлишкового засолення. Показано, що короткочасна (протягом доби) попередня адаптація рослин вівса до  $NaCl$  (400 мМ) знижує наступну токсичну дію  $CuSO_4$  (25 і 50 мкМ).

М. М. Вакерич, В. І. Ніколайчук, Г. М. Денчиля-Сакаль, Я. С. Гасинець, О. П. Ткач

*Ужгородський національний університет*

### **ПРОТЕКТОРНИЙ ЭФФЕКТ ХЛОРИДА НАТРИЯ ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ ОВСА ПОСЕВНОГО К ИЗБЫТКУ СУЛЬФАТА МЕДИ**

Исследован механизм повышения толерантности к воздействию сульфата меди путем предварительной адаптации к избыточному засолению. Показано, что кратковременная (в течение суток) предварительная адаптация растений овса к  $NaCl$  (400 мМ) снижает следующее токсическое воздействие  $CuSO_4$  (25 и 50 мкМ).

M. Vakerich, V. Nikolaychuk, H. Denchilja-Sakal, Y. Hasynets, O. Tkach

*Uzhgorod National University*

### **PROTECTIVE EFFECT OF SODIUM CHLORIDE FOR CULTIVATED OAT'S ADAPTATION TO THE SURPLUS OF COOPER SULPHATE**

Mechanism of increasing tolerance to copper sulfate by way of preliminary adaptation to excessive saltiness was investigated. It is detected that short-term (twenty-four hours) influence of  $NaCl$  (400 mM) on the oat plants reduces the further toxic effects of  $CuSO_4$  (25 and 50  $\mu$ M).

#### **Вступ**

Стійкість скосистеми визначається біотичними та абіотичними факторами. У процесі еволюції шляхом екологічної та фізіологічної регуляції склалися певні взаємовідносини між організмом і навколишнім середовищем [2; 3]. Здатність рослинних організмів адаптуватися до дії важких металів і накопичувати їх у високих концентраціях без порушення фізіологічних функцій важлива для прояву стійкості скосистеми [5]. Солевитривалість культурних рослин іноді прийнято визначати ступенем засолення ґрунту, за якого вони можуть нормально розвиватися та давати високі врожаї [4]. Вивчення адаптивних реакцій рослинних організмів до антропогенного навантаження, що посилюється, у тому числі до забруднення важкими металами, надзвичайно актуальне. Для пошуку засобів захисту рослин від негативного впливу важких

металів (ВМ) і зменшення їх накопичення в сільськогосподарській продукції необхідне вивчення механізмів надходження останніх до рослинного організму, їх фітотоксичного впливу, способів підвищення стійкості до нього, що виробились у рослин у процесі еволюційного розвитку [1].

Адаптація рослин до ВМ пов'язана з функціонуванням спеціалізованих (хелатування, секвестрація та компартментація) та загальних механізмів стійкості (низькомолекулярні органічні стрес-протекторні сполуки, захисні макромолекули та антиоксидантні системи). Питання про те, чи супроводжується адаптація рослин до надлишкового засолення підвищенням толерантності до ВМ (зокрема до купруму), залишається на сьогодні відкритим, а механізми стійкості рослин до одночасної дії двох указаних факторів практично не досліджені. Разом із тим, розуміння механізмів адаптації рослин до комбінованої дії хлоридного засолення та ВМ важливе як із теоретичної точки зору для розуміння загальних механізмів стійкості до екстремальних впливів, так і з практичної, оскільки масштабне техногенне забруднення навколишнього середовища хлористим натрієм і важкими металами все гостріше ставить питання про пошук рослин, здатних активно накопичувати важкі метали в надземних органах [6].

Базуючись на уявленні про механізми крос-адаптації (здатність рослин підвищувати стійкість до даного фактора в результаті адаптації до фактора іншої природи) ми висловили припущення, згідно з яким попередня адаптація рослин до хлориду натрію супроводжується індукцією формування загальних механізмів стійкості, функціонування яких знижує токсичний вплив купруму. Мета даної роботи – перевірка вищезазначеної гіпотези.

### Матеріал і методи дослідження

Рослини *Avena sativa* L. сорту «Чернігівський 27» вирощували у водній культурі в камері фітотрона за денної та нічної температур  $+23...+25$  і  $+18...+20$  °С відповідно. Тривалість фотоперіоду складала 12 годин при інтенсивності освітлення  $350$  мкмоль/м<sup>2</sup>с із натрієвими лампами ДНаЗ Reflux. Насіння висівали в кювети з перлітом. У віці 4–5 тижнів по три рослини пересаджували у скляні посудини ємністю 2 л на модифіковане живильне середовище Johnson [7] із залізом у нітратній формі.

Хлорид натрію до живильного середовища вносили у два прийоми: у перший день концентрацію солі доводили до 200 мМ, на другий – до 400 мМ. Схема внесення сірчаноокислого купруму (25 і 50 мкМ) залежала від мети експерименту: у випадку використання в досліді тільки одного  $CuSO_4$  всю дозу вносили в перший день експерименту; у варіантах зі спільною дією двох факторів ( $NaCl$  і  $CuSO_4$ ) сульфат купруму вносили разом із другою порцією  $NaCl$  або (додаткова серія дослідів) на третю добу експерименту після внесення другої порції  $NaCl$ . Крім того, у другій серії експериментів проводили передобробку рослин сірчаноокислим купрумом. У цьому випадку перше внесення хлориду натрію (200 мМ) здійснювали на третю добу після внесення сульфату купруму, наступне внесення  $NaCl$  (200 мМ) припадало на четверту добу досліді. Фіксацію рослинного матеріалу проводили в усіх варіантах на сьому добу після останнього внесення хлориду натрію чи сірчаноокислого купруму (залежно від варіанта). Біомасу рослин (листіків і стебел) і вміст у них води визначали стандартним ваговим методом, фіксуючи рослинний матеріал протягом 30 хвилин за  $+90$  °С і досушуючи його до постійної ваги за  $+60$  °С.

Інтенсивність транспірації листків визначали загальноприйнятим ваговим методом. Інтенсивність транспірації виражали в  $mg \cdot dm^{-2} \cdot год^{-1}$ . Для оцінки осмотичного потенціалу клітинний сік екстрагували механічним віджиманням за допомогою ручно-

го преса та збирали в пробірки. Вимірювання проводили на осмометрі Osmomat 030 фірми Gonotec (Німеччина). Величину осмотичного потенціалу виражали в МПа.

Для вимірювання  $pH$ , буферної ємності протона в клітинному соці використовували  $pH$ -метр Seven Easy Метлер, Швейцарія. Екстракт отримували шляхом кип'ятіння наважки листків (1 г) протягом 10 хвилин у 10 мл дистильованої води (за неможливості швидкого титрування екстракт зберігали в замороженому стані до проведення аналізу). При визначенні буферної ємності проводили титрування до  $pH = 7,00 \pm 0,05$  малими порціями (10–50 мкл) 10–200 мМ розчинів  $NaOH$ . У випадку порівняно великої буферної ємності проб титрування розпочинали з високих концентрацій  $NaOH$ , після чого переходили до більш низьких. Для розрахунку значення вмісту протона ( $[H^+]$ , мкекв  $\cdot$  г<sup>-1</sup>), враховували об'єм і концентрацію  $NaOH$ , а також масу свіжої тканини. Кожний дослід повторювали не менше 3–4 разів. Аналізи виконували у трьох біологічних повторностях.

### Результати та їх обговорення

У цілому за розвитком рослини, що піддавалися спільному впливу  $NaCl$  і  $CuSO_4$ , незначною мірою відрізнялися від рослин, які вирощувалися за присутності лише  $NaCl$  (400 мМ) у живильному середовищі, а за рівнем накопичення біомаси були навіть кращими за них. Як впливає з даних, наведених у таблиці 1, після 7 діб впливу стресорів, у кінці експерименту біомаса рослин, які вирощувалися за присутності  $NaCl$  і 25 мкМ  $CuSO_4$ , була достовірно вищою біомаси не тільки тих рослин, на які впливав  $NaCl$ , а й контрольних, а у варіанті з  $NaCl$  і 50 мкМ  $CuSO_4$  була не набагато нижчою за контрольний дослід. Таким чином, можна припустити, що зняття засоленням токсичної дії  $CuSO_4$  поєднане з пригніченням поглинання іонів купруму.

За тривалої дії на рослини вівса високих концентрацій сульфату купруму, на сьому добу експерименту виявлялось майже триразове інгібування швидкості транспірації первинних листків (див. табл. 1). Внесення в живильне середовище 400 мМ  $NaCl$  також викликало зниження інтенсивності транспірації, хоча ступінь цього пригнічення був нижчим порівняно з інгібувальним ефектом  $CuSO_4$ . Інтенсивніше, порівняно з  $NaCl$ , пригнічення транспірації відмічалось також у рослин вівса та за спільної дії обох досліджуваних факторів.

Можна припустити, що характер зміни транспірації, що спостерігався, вказує на початок переходу рослин із  $C_3$ -типу фотосинтезу на водозберігальний САМ-шлях фіксації  $CO_2$ . Прямим показником, що підтверджує перехід рослин із  $C_3$ - на САМ-тип фотосинтезу, та таким, що дозволяє оцінити інтенсивність протікання останнього, є рівень титрованої кислотності клітинного соку.

Отримані нами результати показують, що до кінця експерименту величина титрованої кислотності для рослин контрольного варіанта складала 23 мкекв/г сирової маси, що свідчить про ініціацію САМ-типу фотосинтезу (див. табл. 1). Через 7 діб після внесення у живильне середовище 400 мМ  $NaCl$  концентрація протона досягала 48,2 мкекв/г сирової маси, що відповідає САМ-типу середньої інтенсивності. Вплив  $CuSO_4$  викликав значне підвищення інтенсивності перебігу САМ-типу фотосинтезу; концентрація протона в даному варіанті досягала в середньому 82 мкекв/г сирової маси. Близькою була інтенсивність САМ-типу фотосинтезу у рослин, які перенесли одночасний вплив  $CuSO_4$  і  $NaCl$ , оскільки величина титрованої кислотності в даному випадку складала в середньому 73 мкекв/г сирової маси.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що протекторний ефект  $NaCl$  на стійкість рослин вівса до сульфату купруму не може пояснюватися прискоренням пе-

реходу рослин на САМ-тип фотосинтезу або посиленням інтенсивності його перебігу в результаті передобробки рослин *NaCl*, оскільки прямі вимірювання рівня титрованої кислотності не виявили інтенсифікації САМ-типу метаболізму у рослин, що піддавалися впливу *CuSO<sub>4</sub>* після передобробки їх *NaCl*, порівняно з рослинами, які вирощували за присутності одного лише *NaCl*. І все ж, не можна заперечувати певного внеску САМ-типу фотосинтезу як водозберігального механізму адаптації у формуванні стійкості рослин вівса до сульфату купруму в умовах засолення.

Відомо, що інтенсивна акумуляція в рослині солей викликає зниження осмотичного потенціалу клітинного соку та підвищення водопоглинальної здатності клітин кореня, внаслідок чого підвищується загальна оводненість тканин.

Отримані експериментальні дані показують (див. табл. 1), що оводненість листків рослин до сьомої доби дослідження в обох варіантах спільної дії двох факторів складала в середньому 93,9 %, тобто була достовірно вищою оводненості листків рослин, що піддавалися дії сульфату купруму навіть у найнижчій із використаних концентрацій, і практично не відрізнялася від оводненості листків рослин, що вирощувалися за присутності лише одного *NaCl*.

Більш чітко стан водного статусу рослин дозволяє оцінити такий параметр як відносний вміст води (ВВВ) (див. табл. 1). Обробка рослин дослідного варіанта *CuSO<sub>4</sub>* викликала зниження ВВВ майже порівняно з контролем; а значення ВВВ у рослин, що піддавалися спільному впливу *NaCl* і *CuSO<sub>4</sub>*, були дещо вищими.

Окрім загальної оводненості та ВВВ, велике значення для характеристики водного статусу має величина осмотичного потенціалу клітинного соку, який дуже знижується за дії на рослини хлориду натрію (див. табл. 1). Показники осмотичного потенціалу рослин, що піддавалися впливу *CuSO<sub>4</sub>*, займали проміжне положення між значеннями осмотичного потенціалу рослин, вирощених у контрольних умовах і при засоленні. Однак спільний вплив двох факторів викликав різке зниження аналізованого показника в обох варіантах.

Таблиця 1

**Вплив сульфату купруму на морфологічні показники *Avena sativa* L. на фоні передаптації до засолення *NaCl***

Варіант досліджу	Сира вага, г	Інтенсивність транспірації, мг/дм <sup>2</sup> /год.	Вміст сирої речовини, мгекв/г	Сира маса, %	Відносний вміст води в листках, %	Осмотичний потенціал клітинного соку листків, МПа
Контроль	22,1	263,5	22,1	96,30	62,7	-0,79
<i>NaCl</i> , 400 мМ	17,3	207,8	48,2	94,74	58,3	-1,88
<i>CuSO<sub>4</sub></i> , 25 мкМ	7,1	102,1	82,0	91,84	33,1	-1,09
<i>CuSO<sub>4</sub></i> , 50 мкМ	3,5	92,3	86,0	89,29	39,8	-1,26
<i>NaCl</i> , 400 мМ + 25 мкМ <i>CuSO<sub>4</sub></i>	27,1	145,2	74,0	93,90	47,8	-2,99
<i>NaCl</i> , 400 мМ + 50 мкМ <i>CuSO<sub>4</sub></i>	20,7	152,6	72,0	93,87	46,7	-4,54
НПР <sub>0,5</sub>	1,9	18,1	0,15	9,2	3,5	0,15

Наведені дані однозначно свідчать, що короточасна, лише протягом доби, перед-адаптація рослин вівса до *NaCl* (400 мМ) знижує наступну токсичну дію *CuSO<sub>4</sub>* (25 і 50 мкМ). Можна було очікувати, що підвищення тривалості передобробки рослин *NaCl* збільшить ступінь його протекторного ефекту в умовах пошкоджувального впливу досліджуваної солі за рахунок повнішого формування різноманітних механізмів солестійкості, важливих для виживання рослин в умовах пошкоджувальної дії факторів

іншої природи. Однак триваліша (триденна) передобробка рослин  $NaCl$  (400 мМ) не викликала достовірного зниження рівня накопичення купруму в листках і не змінювала інтенсивності транспірації, яка була значно нижчою, ніж у відповідних варіантах досліді з одноденною передаптацією (табл. 2).

Таблиця 2

**Вплив  $CuSO_4$  на інтенсивність транспірації *Avena sativa* L. на фоні триденної передаптації до засолення  $NaCl$**

Варіант досліді	Інтенсивність транспірації, мг/дм <sup>2</sup> /год
Контроль	256,4
$NaCl$ , 400 мМ	198,8
$CuSO_4$ , 25 мкМ	106,3
$CuSO_4$ , 50 мкМ	89,3
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 25 мкМ	112,2
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 50 мкМ	116,4
ІПП <sub>0,5</sub>	10,9

Разом із тим, збільшення часу передаптації рослин до  $NaCl$  викликало збільшення оводненості листків за наступного одночасного впливу 400 мМ  $NaCl$  і 25 (але не 50) мкМ  $CuSO_4$  (табл. 3). Це дозволяє зробити висновки, що передобробка рослин  $NaCl$  протягом доби була достатньою для індукції захисних механізмів, що забезпечують зниження токсичного впливу  $CuSO_4$  в умовах одночасного впливу двох указаних факторів.

Таблиця 3

**Вплив  $CuSO_4$  на загальний вміст води в листках *Avena sativa* L. на фоні триденної передаптації до засолення  $NaCl$**

Варіант досліді	Вміст сирої маси, %
Контроль	95,60
$NaCl$ , 400 мМ	94,25
$CuSO_4$ , 25 мкМ	91,44
$CuSO_4$ , 50 мкМ	88,95
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 25 мкМ	93,78
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 50 мкМ	89,10
ІПП <sub>0,5</sub>	1,80

Таблиця 4

**Вплив  $CuSO_4$  та післядії  $NaCl$  на вміст води в листках *Avena sativa* L.**

Варіант досліді	Вміст сирої маси, %
Контроль	96,30
$NaCl$ , 400 мМ	94,50
$CuSO_4$ , 25 мкМ	90,98
$CuSO_4$ , 50 мкМ	89,23
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 25 мкМ	88,34
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 50 мкМ	87,40
ІПП <sub>0,5</sub>	1,90

У зв'язку з дослідженням характеру взаємодії відповідей рослин на послідовну та одночасну дію  $NaCl$  і  $CuSO_4$  важливо відповісти на питання, чи реалізується виявлена захисна дія хлориду натрію після попередньої адаптації рослин до  $CuSO_4$ . Отримані дані доводять, що внесення до живильного середовища хлориду натрію через 3 доби після початку впливу на рослини сульфату купруму достовірно знижувало оводненість листків (табл. 4) і не впливало на інтенсивність транспірації (табл. 5) порівняно з рослинами, в яких впливу  $CuSO_4$  передувала 1–3-добова адаптація до  $NaCl$ .

**Вплив  $CuSO_4$  на інтенсивність транспірації *Avena sativa* L.  
на фоні триденної передаптації до засолення  $NaCl$**

Варіант досліджу	Інтенсивність транспірації, $ml/m^2/h$ год
Контроль	256,4
$NaCl$ , 400 мМ	198,8
$CuSO_4$ , 25 мкМ	106,3
$CuSO_4$ , 50 мкМ	89,3
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 25 мкМ	107,2
$NaCl$ , 400 мМ + $CuSO_4$ , 50 мкМ	99,4
ІПР <sub>0,5</sub>	12,1

Звідси випливає, що попередній вплив на рослини вівса сульфату купруму не тільки не посилював захисний ефект  $NaCl$  за одночасної дії двох факторів, а навпаки, знижував адаптаційний потенціал рослин, що виражалося, наприклад, у різкому зниженні оводненості тканин.

### Висновки

Попередня адаптація рослин до  $NaCl$  значно знижує наступний токсичний вплив  $CuSO_4$ , що проявляється, перш за все, у підтриманні водного статусу рослин в умовах одночасного впливу двох факторів. Навпаки, попередній вплив на рослини сульфату купруму перешкоджає реалізації захисного ефекту хлориду натрію в умовах одночасної дії засолення та важких металів.

Наведені дані можуть бути використані при розробці технології рекультиватії земель, забруднених декількома політантами різного походження. Не останнє місце серед таких територій займають площі з високим ступенем засолення та забруднення важкими металами.

### Бібліографічні посилання

1. Гура.льчук Ж. З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії. – К. : Логос, 2006. – 208 с.
2. Квяк Н. Я. Фізіолого-біохімічні механізми адаптації епіфітного моху *Leskea polycarpa* до токсичної дії важких металів // Живлення рослин: теорія і практика. – К. : Логос, 2005. – С. 386–395.
3. Строганов Н. С. Общая экология. Биоценология. Гидробиология. – М., 1976. – С. 363–367.
4. Шахов А. А. Солеустойчивость растений. – М. : Изд-во АН СССР, 1956. – 552 с.
5. Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp) / V. Angelova, R. Ivanova, V. Delibaltova, K. Ivanov // Industrial Crops and Products. – 2004. – N 19. – P. 197–205.
6. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction / E. Lombi, F. J. Zhao, S. J. Dunham, S. P. McGrath // J. Environ. Qual. – 2001. – N 30. – P. 1919–1926.
7. Rengel Z. Wheat genotypes differ in zinc efficiency when grown in the chelate-buffered nutrient solution / Z. Rengel, R. D. Graham // I. Growth. Plant Soil. – 1995. – Vol. 176. – P. 307–316.

Надійшла до редакції 29.06.2011