

**ВПЛИВ АБІОТИЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ  
ПОЛ І АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ У ПАГОНАХ  
ВОДНОГО МОХУ *FONTINALIS ANTIPYRETICA* HEDW.****Н. Кияк\*, І. Микієвич\*\***

\*Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Стефаника, 11, Львів 79000, Україна  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

\*\*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: biofr@franko.lviv.ua

Досліджено вплив іонів важких металів (свинцю та кадмію), водного дефіциту і теплового стресу на вміст МДА й активність супероксиддисмутаз у пагонах водного моху *Fontinalis antipyretica*. Показано, що абіотичні стресові фактори призводять до посилення процесу ліпопероксидації та індують зростання активності супероксиддисмутаз. Найбільші покази активності прооксидантно-антиоксидантної системи встановлено під впливом підвищених доз осмотичного, температурного стресів та іонів кадмію. Встановлено, що зміни рівня ПОЛ і активності СОД у несприятливих умовах залежать від специфіки й інтенсивності стресового фактора.

*Ключові слова:* важкі метали, тепловий стрес, водний дефіцит, малоновый диальдегід, супероксиддисмутаза.

Рослини протягом життєвого циклу перебувають під впливом таких стресових факторів природного й антропогенного походження, як дефіцит чи надлишок вологи, інтенсивне сонячне світло, температурні зміни, засолення, техногенні токсичні гази, важкі метали та пестициди. Вони суттєво модифікують усі метаболічні процеси рослин, тому на будь-які зміни у середовищі існування рослини реагують комплексом адаптаційних перебудов (анатомо-морфологічних, фізіологічних, біохімічних), спрямованих на збереження життєздатності організму у мінливих умовах. Здатність рослин швидко реагувати на зміни умов існування є їхньою життєво важливою особливістю. Характер реакції-відповіді залежить від фізіологічного стану організму, типу стресового фактора, інтенсивності та тривалості його дії.

Однією з найважливіших неспецифічних реакцій організмів на несприятливі чинники є активація в клітинах молекулярного кисню з утворенням його відновлених форм. Цей процес та індуковане ним перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) є ключовою ланкою між стресовим впливом та реалізацією захисних реакцій організму [6]. Процеси ПОЛ характеризують стан біомембран клітин, які першими сприймають вплив стресових факторів, тому, оцінюючи інтенсивність пероксидації мембранних ліпідів, можна контролювати первинні процеси адаптації рослин до комплексу екологічних факторів [11].

У зв'язку з цим досліджували зміни вмісту малонового диальдегіду (МДА) (як показника ПОЛ) і активності супероксиддисмутаз (СОД) у пагонах водного моху *Fontinalis antipyretica* Hedw. у відповідь на 24-годинну дію різноманітних абіотичних стресових факторів: теплового шоку, водного дефіциту і важких металів (свинцю та кадмію).

У дослідях використовували пагони водного моху *F. antipyretica*, які вирощували в люмінастаті на водному поживному середовищі Кноп-II в контрольованих умовах освітлення (2500–3000 лк), температури (20–22°C) та вологості (85–90%) [4].

Ацетат свинцю та хлорид кадмію додавали в середовище у концентраціях 1,0, 10,0 та 100,0 мкМ. Температурний стрес імітували дією підвищених температур +30°C, +35°C та +40°C. Для створення водного дефіциту в інкубаційне середовище додавали поліетиленгліколь (ПЕГ) у концентраціях 10%, 20% і 30%. Рослини витримували у стресових умовах протягом доби і використовували для подальших досліджень.

Для визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) рослинний матеріал гомогенізували у 20% розчині трихлороцтової кислоти й інкубували з 0,5% розчином тіобарбітурової кислоти на киплячій водяній бані протягом 30 хв. У супернатанті, отриманому після центрифугування, спектрофотометрично визначали вміст МДА за довжини хвилі 532 нм та виражали в нМ МДА на 1 г сирової маси [8].

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) рослинний матеріал гомогенізували в 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8) й екстрагували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Супернатант, отриманий після центрифугування (10 хв, 5000 g), додавали до інкубаційного середовища, що містило 0,33 мМ ЕДТА, 0,4 мМ нітросиній тетразолій, 0,01 мМ феназинметсульфат та 0,8 мМ НАДФН. Оптичну густину розчину вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм. Активність СОД виражали в умовних одиницях на мг білка за хв [10].

Усі досліді проводили у 3-кратній повторності. Отримані результати опрацьовували методами статистичного аналізу [9].

Як показник росту визначали приріст маси сухої речовини рослинного матеріалу. Встановлено, що усі чинники призводили до зниження сухої ваги пропорційно до підвищення їхньої концентрації, але найбільший негативний вплив виявлено під дією температурного й осмотичного стресів (70–75% від контролю) (рис. 1). Отже, водний мох є достатньо чутливим до різних абіотичних стресів, які індукували суттєве пригнічення

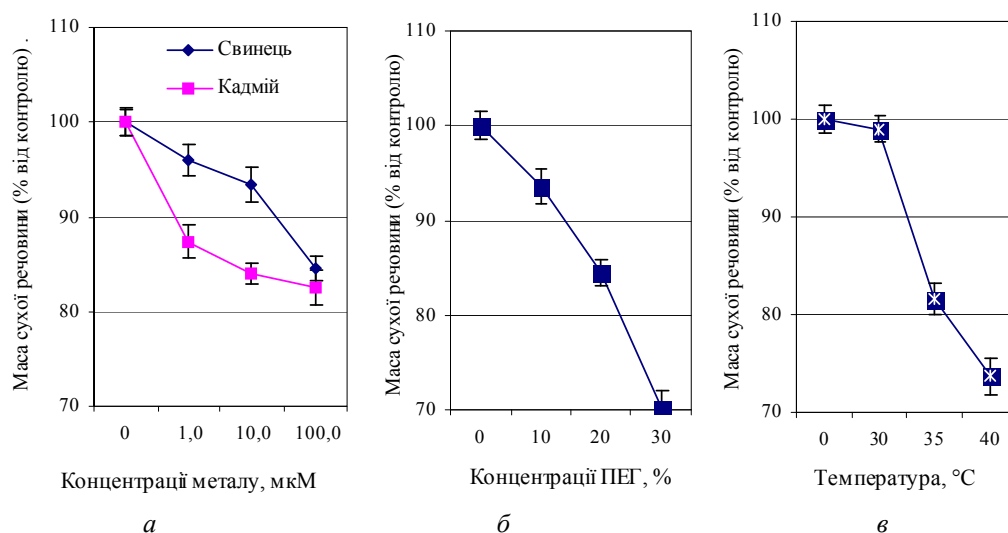


Рис. 1. Вплив абіотичних стресових факторів: а – ацетату свинцю та хлориду кадмію; б – водного дефіциту; в – температурного стресу на суху вагу пагонів моху *F. antipyretica*.

росту. Висока чутливість до водного дефіциту встановлена й для інших водних макрофітів, що пов'язане з інгібуванням гормонального метаболізму та значними змінами водного режиму [23].

Рівень ПОЛ у пагонах *F. antipyretica* під впливом стресових факторів тестували за кількістю малонового діальдегіду, оскільки пряма залежність між нагромадженням МДА й інтенсивністю пероксидного окислення є встановленим фактом [2]. У наших досліджах усі стресові чинники призводили до збільшення вмісту МДА. Крім того, виявлено чітку кореляцію між рівнем ПОЛ і дозою абіотичного фактора, оскільки підвищені концентрації кожного з них індукували вірогідне зростання вмісту показника пероксидації ліпідів. Максимальне підвищення кількості МДА (в 1,7–2 рази порівняно з контролем) виявлено під впливом сублетальної концентрації хлориду кадмію, 30% ПЕГ та високотемпературного стресу (35–40°C) (рис. 2). Аналогічна тенденція посилення інтенсивності ПОЛ зі збільшенням дози стресора встановлена в листках кукурудзи та вівса за дії фтору [3], у паростках кукурудзи в умовах водного дефіциту і теплового шоку [7], у рослин соняшника під впливом іонів міді й іонів кадмію [16]. Підсумовуючи літературні дані, можна відзначити, що активація процесів ПОЛ у несприятливих умовах середовища супроводжується різноманітними модифікаціями метаболізму рослин, котрі зумовлені як безпосереднім окисленням ліпідів мембран, так і накопиченням продуктів ПОЛ і їхньою взаємодією з клітинними макромолекулами.

Тому інтенсивність ПОЛ – важливий показник ступеня впливу різноманітних стресових факторів на організм, і його вивчення дає цінну інформацію про функціональний стан організму, його неспецифічні адаптаційні можливості. Порівняльне вивчення впливу різних абіотичних стресових факторів на вміст малонового діальдегіду як показника ПОЛ дало змогу встановити залежність між типом стресового фактора, його дозою та інтенсивністю ПОЛ.

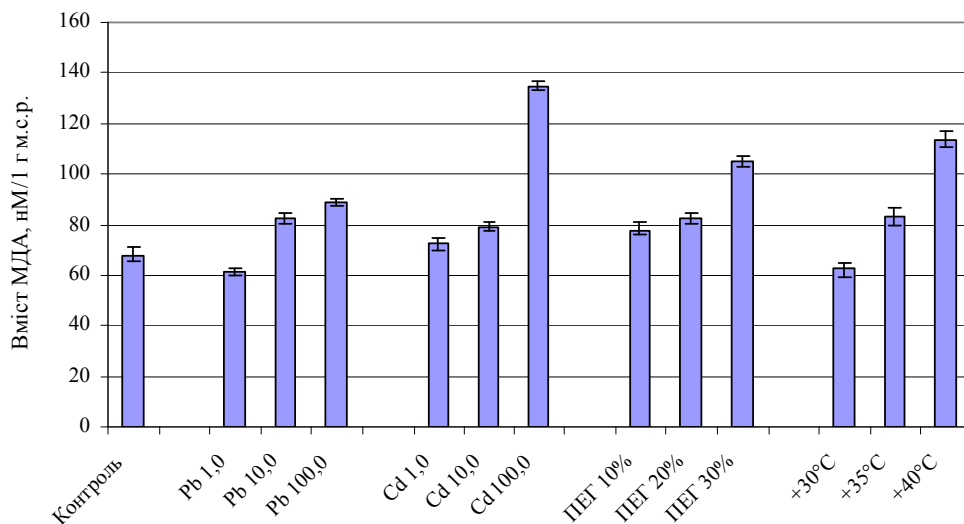


Рис. 2. Вплив абіотичних стресових факторів на вміст малонового діальдегіду у пагонах моху *F. antipyretica*. Умовні позначення: контроль – середовище Кноп-П з мікроелементами; Pb 1,0–100,0 – концентрації ацетату свинцю, мкМ; Cd 1,0–100,0 – концентрації хлориду кадмію, мкМ; ПЕГ 10%–30% – концентрації поліетиленгліколю; +30°C–+40°C – температурні умови.

Зміни інтенсивності процесу ліпопероксидації супроводжувалися перебудовами в антиоксидантній системі рослин, одним із компонентів якої є супероксиддисмутаза. Цей фермент забезпечує первинний захист клітин і тканин від окислювальної деструкції, каталізуючи реакцію дисмутації супероксидного аніон-радикала і тим самим зупиняючи процес окислення клітинних макромолекул ще на стадії ініціювання. У наших дослідах інтенсивність ПОЛ корелювала з активністю супероксиддисмутази (СОД). Активність ферменту також залежала від природи стресового фактора та його концентрації: за низьких доз стресорів активність зберігалася на рівні контролю або незначно зростала (рис. 3). Найнижчі показники активності було встановлено під впливом іонів свинцю. Навіть за дії сублетальної концентрації цього металу (100,0 мкМ) спостерігалася незначне зростання активності СОД (у 1,5 рази порівняно з контролем), тоді як аналогічна доза хлориду кадмію індукувала підвищення активності майже у 4 рази порівняно з контролем.

Як показали наші результати, 100,0 мкМ концентрація хлориду кадмію призводила до максимального збільшення і вмісту МДА, й активності ферменту у пагонах *F. antipyretica*. Такий ефект може бути спричинений вищою токсичністю іонів кадмію, оскільки відомо, що за своїми фізико-хімічними властивостями (електронегативністю, спорідненістю до окремих хімічних груп і здатністю до комплексоутворення в живому організмі) кадмій є суттєво небезпечнішим порівняно зі свинцем [5]. Крім того, встановлено, що причиною розвитку кадмій-індукованого оксидного стресу є здатність цього важкого металу вступати в конкурентні взаємодії з мікроелементами зі змінною валентністю – міддю та залізом [15]. Зміна біодоступності цих металів у клітині сприяє їхній взаємодії з молекулярним киснем та утворенню гідроксильних радикалів – найактивніших прооксидантів, підвищена генерація яких призводить до швидкого наростання процесів ПОЛ [25].

В умовах водного стресу активність ферменту зростала майже в 3 рази, навіть за дії невисоких концентрацій поліетиленгліколю, що може свідчити про досить високий рівень антиоксидантного захисту водного моху в умовах водного дефіциту. Подібні результати були отримані й для інших водних рослин [24].

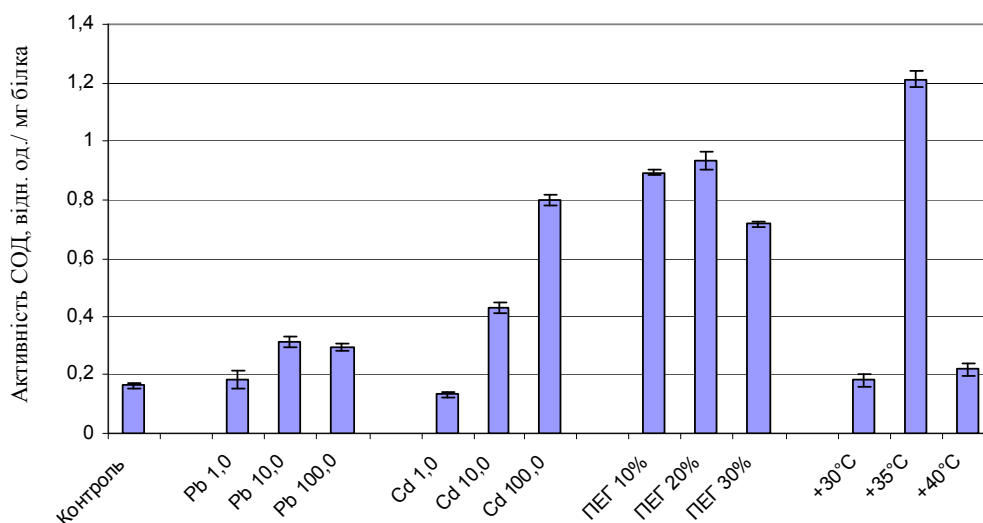


Рис. 3. Вплив абіотичних стресових факторів на активність супероксиддисмутази у пагонах моху *F. antipyretica*. Умовні позначення – як на рис. 2.

Зростання активності ферменту під дією різних стресових впливів могло бути зумовлене активацією його латентних форм і (або) синтезом нових молекул ферменту [1]. Так, одночасне збільшення активності СОД і кількості відповідних білків було виявлено під впливом сольового стресу в хлоропластах гороху [17] та в листках толерантного сорту *Lycopersion pennellii* [20], в хлоропластах пшениці після обробки рослин розчином міді [21].

У пагонах *F. antipyretica* високу активність СОД було встановлено й під впливом температури 35°C (у 6 разів більшу, ніж у контролі), тоді як температура понад 35°C ініціювала спад активності ферменту. Аналогічні зміни були встановлені у листках пшениці в умовах температурного стресу – підвищення активності за температури +30 – +35°C та зниження за +40°C, очевидно, внаслідок теплової денатурації ферменту [22]. У ряді публікацій теж було відзначено зменшення активності СОД унаслідок досить інтенсивного та тривалого впливу стресового фактора, як, наприклад, під впливом важких металів [19], УФ-опромінення [13] та теплового стресу [18]. Причини зниження активності можуть бути різноманітні: виснаження пулу СОД посиленням його використання для нейтралізації супероксидних радикалів, пошкодження та фрагментація молекул ферменту під впливом вільних гідроксильних радикалів [14].

Отже, несприятлива дія важких металів, теплового шоку та водного дефіциту призводить до посилення перекисного окислення ліпідів у клітинах *F. antipyretica* й індукує зростання активності супероксиддисмутази. Тобто у відповідь на підвищення рівнів ПОЛ організм мобілізує систему захисту від окислювальних пошкоджень, що проявляється у збільшенні антиоксидантної активності, і таким чином забезпечується його адаптація до змінних умов. Відомо, що припинення дії стресора призводить до зниження інтенсивності ПОЛ і, відповідно, активності антиоксидантів, що було показано у рослин *Alisma plantago-aquatica* в умовах зволоження субстрату після посухи [6]. Існує припущення, що антиоксиданти – критичні компоненти захисту рослин від окислювального стресу та що від їхнього стану залежить подальша доля клітин і тканин в екстремальних умовах: збереження функцій чи окислювальна деструкція [12]. У наших дослідках теж було встановлено кореляцію між зростанням вмісту МДА й активністю СОД. Крім того, обидва показники суттєво залежали від природи стресового фактора та його інтенсивності.

Абіотичні стресові фактори (важкі метали, тепловий стрес і водний дефіцит) призводять до посилення процесу ліпопероксидації у клітинах *F. antipyretica* й індукують зростання активності супероксиддисмутази.

Найвищі показники активності прооксидантно-антиоксидантної системи встановлені під впливом підвищених доз осмотичного, температурного стресів та іонів кадмію.

Зміни рівня ПОЛ і активності СОД у несприятливих умовах суттєво залежать від специфіки стресового фактора та його інтенсивності.

1. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–475.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 136 с.
3. Гришко В. Н., Сищиков Д. В. Процеси перекисного окиснення ліпідів та функціонування деяких антиоксидантних ферментативних систем у кукурудзи при дії HF // Доп. НАН України. 2000. № 2. С. 191–195.
4. Демкив О. Т., Сьтник К. М. Морфогенез архегоніат. К.: Наук. думка, 1985. 204 с.
5. Ильин В. Б., Степанова М. Д. Распределение свинца и кадмия в растениях пшеницы, произрастающих на загрязненных этими металлами почвах // Агротехника. 1980. № 5. С. 114–117.

6. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях // Под ред. Е.Л. Кордюм. К.: Наук. думка, 2003. 277 с.
7. Молодченкова О. О. Влияние салициловой кислоты на ответные реакции проростков кукурузы при абиотических стрессах // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 3. № 15. С. 24–32.
8. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин. К.: Фітосоціоцентр, 2001. 392 с.
9. Плохинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
10. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. 1991. № 10. С. 9–13.
11. Чиркова Т. В., Новицкая Л. О., Блохина О. Б. Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных систем при аноксии у растений с разной устойчивостью к недостатку кислорода // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 1. С. 65–73.
12. Allen R. D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants // Plant Physiol. 1995. N 107. P. 1049–1054.
13. Barka E. A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C // Austr. J. Plant Physiol. 2001. N 28. P. 785–791.
14. Casano L. M., Gomes L. D., Lascano H. R. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress // Plant Cell Physiol. 1997. N 38. P. 433–440.
15. Chelomin V. P., Bobkova E. A., Lukyanova O. N., Chekmasova N. M. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis* // Comp. Biochem. Physiol. Ser. 1995. Vol. 110. N 3. P. 329–335.
16. Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // Biol. Plant. 1999. Vol. 42. N 1. P. 49–55.
17. Gomez J., Jimenez A., Olmos E., Sevilla F. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum*, cv. Puget) chloroplasts // J. Exp. Bot. 2003/4. Vol. 55. P. 119–130.
18. Liu X. Z., Huang B. R. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass // Crop. Sci. 2000. N 40. P. 503–510.
19. Mishra A., Choudhuri M. A. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice // Biol. Plant. 1999. Vol. 42. N 3. P. 409–415.
20. Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* // Plant. Cell Envir. 2003. Vol. 26. P. 845–856.
21. Navari-Izzo F., Milone M. T. A., Quartacci M. F. Metabolic changes in wheat plant subjected to a water-deficit stress programme // Plant Sci. 1993. Vol. 92. P. 151–157.
22. Panda S. K., Khan M. H. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress // Braz. J. Plant Physiol. 2004. Vol. 16. N 2. P. 115–118.
23. Rout N. P., Shaw B. P. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidant enzymes // Plant Sci. 2000a. N 160. P. 415–423.
24. Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and function of a multi-faceted molecule // Curr. Opin. Plant Biol. 2000. N3. P. 229–235.
25. Stohs S. J., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // Free Rad. Biol. Med. 1995. Vol. 18. N 2. P. 312–336.

**THE INFLUENCE OF ABIOTIC STRESS FACTORS ON THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY IN SHOOTS OF AQUATIC MOSS *FONTINALIS ANTIPYRETICA* HEDW.**

**N. Kyjak\*, I. Mykiyevych\*\***

*\*Institute of Ecology of the Carpathians of NAS of Ukraine  
11, Stefanyk St., Lviv 79000, Ukraine  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

*\*\*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

The influence of ions of heavy metals (lead and cadmium), water deficit and thermal stress on the content of malonic dialdehyde and superoxide dismutase activity in shoots of the aquatic moss was investigated. It was shown that the abiotic stress factors intensified lipid peroxidation process and increased the superoxide dismutase activity. The increasing of osmotic potential, temperature and concentration of cadmium ions stimulated the highest activity of prooxidative and antioxidative systems. It was established, that the changes of intensity of the lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in the stress conditions depended on specificity and intensity of the stress factor.

*Key words:* heavy metals, thermal stress, water deficit, malonic dialdehyde, superoxide dismutase.

**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПОЛ И АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ПОБЕГАХ ВОДНОГО МХА *FONTINALIS ANTIPYRETICA* HEDW.**

**Н. Кияк\*, И. Микиевич\*\***

*\*Институт экологии Карпат НАН Украины  
ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

*\*\*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: biofr@franko.lviv.ua*

Исследовано влияние ионов тяжелых металлов (свинца и кадмия), водного дефицита и теплового стресса на содержание МДА и активность супероксиддисмутазы в побегах водного мха. Показано, что абиотические стрессовые факторы приводят к усилению процесса липопероксидации и индуцируют возрастание активности супероксиддисмутазы. Самые высокие показания активности прооксидантно-антиоксидантной системы установлены под влиянием повышенных доз осмотического и температурного стрессов, а также ионов кадмия. Установлено, что изменения уровня ПОЛ и активности СОД в неблагоприятных условиях зависят от специфики и интенсивности стрессового фактора.

*Ключевые слова:* тяжелые металлы, тепловой стресс, водный дефицит, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза.

Стаття надійшла до редколегії 18.02.10

Прийнята до друку 11.05.10