



23. Дубына Д. В., Дзюба Т. П. Синтаксономическое разнообразие растительности устьевой области Днепра // Растительность России. 2008. № 13. С. 27–48.
24. Чемерис Е. В. Растительный покров истоковых ветландов Верхнего Поволжья. Рыбинск : Рыбинский дом печати, 2004. 158 с.
25. Ferrez Y., Bailly G., Fernex T., Guyonneau J., Royer J.-M., Schmitt A., Vuilleminot M. Connaissance des habitats naturels et semi-naturels de Franche-Comté. Synopsis des groupements végétaux de Franche-Comté. Version provisoire – avril 2009. Conservatoire botanique national de Franche-Comté, Besançon, 2009. 56 p.
26. Кузьменко А. А. Растительность моренных и водноледниковых равнин южной окраины Смоленской возвышенности : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Брянск, 2014. 20 с.

УДК 581.2

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В РАСТЕНИЯХ ОГУРЦА И РЕДИСА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И. Д. Михайлова, А. С. Лукаткин

Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева, Саранск
E-mail: aslukatkin@yandex.ru



Исследовали влияние ионов тяжелых металлов (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) в концентрациях 10 мкМ, 0,1 мМ, 1 мМ на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в 7-дневных проростках огурца (*Cucumis sativus* L.) и редиса (*Raphanus sativus* L.). Выявлено, что ионы Ni^{2+} и Cu^{2+} индуцировали окислительный стресс в клетках растений, но ионы Pb^{2+} и Zn^{2+} не оказали токсического воздействия. Для растений огурца показано возрастание интенсивности ПОЛ в ряду $\text{Zn}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$; редиса – $\text{Pb}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ni}^{2+}$.

Ключевые слова: *Cucumis sativum* L., *Raphanus sativus* L., тяжелые металлы, перекисное окисление липидов, окислительный стресс.

Lipid Peroxidation in Cucumber and Radish Seedlings Affected by Heavy Metals

I. D. Michailova, A. S. Lukatkin

The effect of heavy metal ions (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) in concentrations of 10 μM , 0.1 μM and 1 mM on the rate of lipid peroxidation (LPO) has been studied in the 7-day-old seedlings of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). It was revealed that Ni^{2+} and Cu^{2+} ions induced oxidative stress in plant cells, but Pb^{2+} and Zn^{2+} ions did not have toxic effects. The heavy metals effect on LPO increasing was as follows: $\text{Zn}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$ for cucumber plants; $\text{Pb}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ni}^{2+}$ for radish plants.

Key words: *Cucumis sativus* L., *Raphanus sativus* L., heavy metals, lipid peroxidation, oxidative stress.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-206-210

Введение

Одной из наиболее актуальных проблем современной физиологии растений является взаимодействие растений с факторами окружающей среды [1]. В связи с ростом техногенной нагрузки на живые организмы особого внимания требует изучение механизмов их адаптации к не-

благоприятным антропогенным факторам среды. Одним из наиболее опасных для растений стрессорным фактором является действие избыточных доз тяжелых металлов (ТМ): они способны к биоаккумуляции и концентрированию при движении по трофической цепи; их трудно разрушить или преобразовать в ходе химических процессов; удаление ТМ из организма затруднено, поскольку они прочно связываются с белками и другими компонентами клеточных структур; ТМ пагубно влияют на рост растения, вызывают нарушения фотосинтеза и других физиологических процессов [2]. В то же время имеются данные о положительном влиянии некоторых доз различных ТМ на рост, содержание пигментов, уменьшение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3].

Уровень адаптации растений в значительной степени определяется соотношением уровня ПОЛ и активности антиоксидантной защиты [4]. Установлено, что ТМ продуцируют образование активных форм кислорода (АФК): супероксидного анион-радикала (O_2^-), гидроксильных радикалов (OH^\cdot), синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), перекиси водорода (H_2O_2) [5]. Увеличение продукции АФК ведет, в свою очередь, к активации окислительных процессов, таких как ПОЛ, в норме протекающих на определенном стационарном уровне [6]. Увеличение интенсивности данного процесса вызывает изменения как свойств липидного матрикса, так и клеточного метаболизма, что обуславливает важность поддержания определенной скорости ПОЛ в стрессовых условиях [4, 5]. В ряде работ показано дифференцированное влияние ТМ как на генерацию



АФК, так и на компоненты антиоксидантной защиты, и в итоге – на накопление реагирующих с тиобарбитуровой кислотой соединений (ТБКРС), указывающих на интенсивность ПОЛ [5–8]. Так, у Cd-толерантного сорта (*Vigna radiata*, cv. Pusa 9531) наблюдалось более интенсивное индуцированное Cd повышение ТБКРС, чем у Cd-чувствительного сорта (cv. PS16); авторы предположили, что это результат высокого клеточного редокс-гомеостаза у первого [7]. Есть данные, что как токсичные, так и эссенциальные ТМ/металлоиды вызывали усиление ПОЛ, зависимое от их дозы и вида растений [8, 9].

Наличие неоднозначных данных по эффектам ТМ на про/антиоксидантные процессы в растениях привлекает интерес к изучению проблемы дозовых зависимостей на показатели ПОЛ и антиоксидантной защиты в растительном организме. В связи с этим целью исследования было сравнительное изучение влияния различных доз ионов нескольких ТМ (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) на интенсивность ПОЛ в проростках огурца и редиса.

Материал и методы

Объектом исследования служили 7-дневные проростки огурца (*Cucumis sativus* L., сорт Единство) и редиса (*Raphanus sativus* L., сорт Красный великан), выращенные в водной культуре на растворах солей ТМ ($\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) в концентрациях 10 мкМ, 0,1 мМ, 1 мМ (контроль – H_2O). Опыт проводили при плотности потока фотонов около 80 мкмоль $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, температуре 22–24°C, фотопериоде 12 часов. Спустя 7 суток роста в листьях спектрофотометрическим методом определяли интенсивность ПОЛ по образованию малонового диальдегида (МДА) в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [10]. Навеску ткани листьев (1 г) гомогенизировали в 10 мл среды выделения (0,1 М трис-НСl буфер pH 7,6, содержащий 0,35 М NaCl). К 3 мл гомогената добавляли 2 мл ТБК в 20% трихлоруксусной кислоте, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут и фильтровали. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре UVmini-1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 532 нм против среды выделения с реагентом. Концентрацию МДА рассчитывали по молярной экстинкции ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Количество МДА в листьях рассчитывали в микромолях / г сырой массы листьев [10].

Все определения проводили в 4 отдельных опытах, каждый из которых состоял из 4–6 биологических повторностей. Значения на рисунках

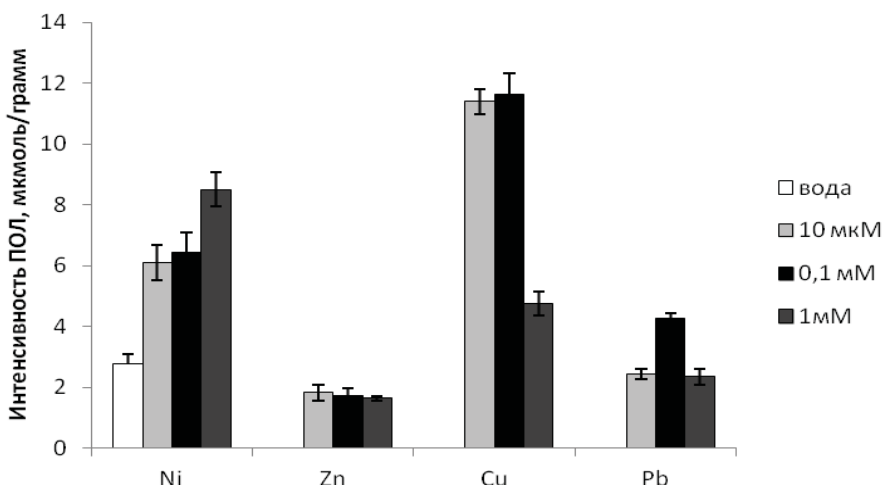
представляют средние арифметические из всех опытов с их стандартными ошибками. Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007.

Результаты и их обсуждение

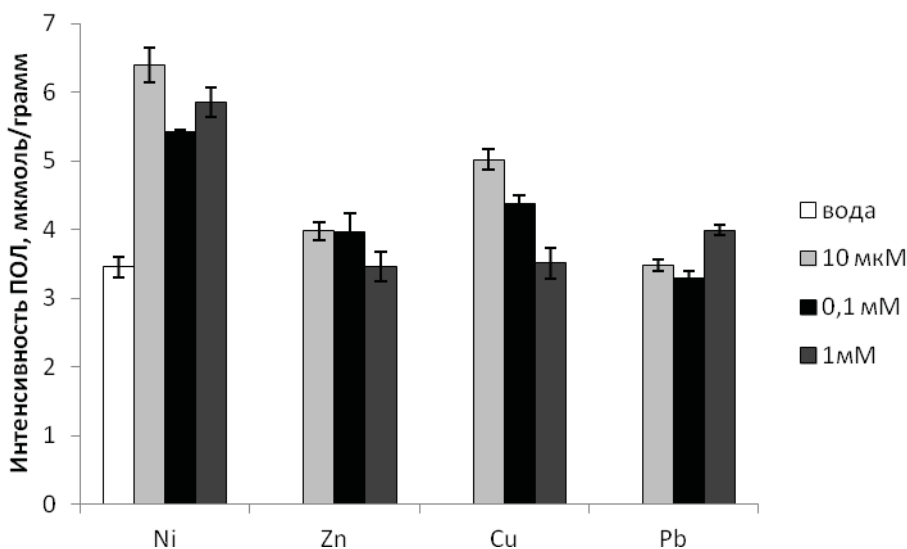
При действии различных ТМ на растения происходит интенсификация окислительных реакций, приводящая к окислительной деструкции клеток, вызывая многочисленные нарушения, ведущие к повреждению и гибели. Возрастание АФК в растительных клетках при действии стрессоров приводит к окислительному стрессу, который наблюдали у растений под действием кадмия [11], меди [12], свинца [13], никеля [14], кобальта [15]. В условиях повышенных концентраций этих металлов в среде растения, вероятно, генерируют больше АФК, чем могут детоксицировать механизмы гашения.

В растениях *огурца* ионы Ni^{2+} увеличивали интенсивность ПОЛ при всех дозах, особенно сильно при сублетальной (1 мМ) – в 3,2 раза; отмечена тенденция к повышению уровня ПОЛ в листьях с увеличением концентрации Ni^{2+} (рисунок, а). Для ионов Zn^{2+} показана иная картина: здесь все дозы металла не вызывали ярко выраженной интенсификации ПОЛ, и выявлена слабая тенденция к уменьшению интенсивности ПОЛ с увеличением концентрации ионов. Ионы Cu^{2+} , в свою очередь, увеличивали интенсивность ПОЛ при всех концентрациях, причем увеличение данного показателя почти в 4,3 раза зафиксировано при дозах 10 мкМ и 0,1 мМ (при дозе 1 мМ увеличение ТБКРС было не столь значительным). Это говорит об особо неблагоприятном влиянии ионов меди на растение огурца, поскольку усиление ПОЛ является показателем значительного повреждения ненасыщенных мембранных липидов и, следовательно, клеточных мембран [6, 10]. При добавлении в среду выращивания ионов свинца не выявлено четкой зависимости концентрационного влияния на интенсивность ПОЛ, так как уровень МДА при низкой и высокой дозах металла оставался на уровне контроля и возрастал лишь при средней концентрации Pb^{2+} в среде выращивания.

На основании проведенного опыта можно сказать, что на интенсивность перекисного окисления липидов в листьях молодых растений огурца наибольшее влияние оказали ионы Cu^{2+} и Ni^{2+} (во всех концентрациях), что свидетельствует о весьма токсичном влиянии данных ионов на липидную компоненту мембран проростков огурца. Практически не обнаружено усиления ПОЛ в листьях огурца при действии ионов Pb^{2+} и Zn^{2+} .



а



б

Влияние тяжелых металлов на интенсивность перекисного окисления липидов в 7-дневных проростках а – огурца; б – редиса. Значение водного контроля, приведенное для никеля, идентично для водного контроля цинка, меди и свинца; данные представляют средние арифметические из всех опытов с их стандартными ошибками

В растениях *редиса* ионы Ni^{2+} вызывали максимальное (в 1,6–1,8 раз) увеличения интенсивности ПОЛ относительно водного контроля (рисунок, б). Для ионов Zn^{2+} не выявлено изменения уровней ТБКРС при любых концентрациях ТМ (различия с водным контролем недостоверны), при этом в субоптимальной концентрации (10 мкМ) и 0,1 мМ наблюдали тенденцию к увеличению интенсивности окислительных процессов, в то время как при концентрации 1 мМ изучаемый показатель оставался на уровне контроля. Для ионов Cu^{2+} выявлена парадоксальная зависимость – в малой дозе 10 мкМ происходило увеличение накопления МДА, тогда как с уве-

личением концентрации шло снижение данного показателя, т. е. с увеличением концентрации ионов меди интенсивность ПОЛ снижалась, и самые высокие дозы (1 мМ) не показали увеличения ПОЛ в листьях редиса. Ионы Pb^{2+} вызывали увеличение интенсивности ПОЛ только при концентрации 1 мМ.

Таким образом, было показано, что в растениях редиса ионы Ni^{2+} и Cu^{2+} (так же, как и в листьях огурца) индуцировали усиление ПОЛ в широком диапазоне концентраций, тогда как для ионов Pb^{2+} и особенно Zn^{2+} такой эффект практически отсутствовал (за исключением концентрации 1 мМ в опыте с солью свинца).



Очевидно, что интенсивное накопление продукта окисления липидов – МДА свидетельствует о весьма неблагоприятном воздействии определенных концентраций ТМ.

Полученные результаты можно интерпретировать в нескольких аспектах. Во-первых, ТМ могут потенциально индуцировать ПОЛ в растениях в силу того, что способствуют генерации АФК [5]. При этом необходимо отметить, что редокс-активные металлы (такие как Cu, Cr, Fe) могут прямо индуцировать ПОЛ через генерируемые в редокс-циклах АФК, тогда как редокс-неактивные ТМ (в частности, Cd, Co, Hg, Ni, Pb, Zn и т.п.) нарушают работу антиоксидантной системы и со временем приводят к усилению ПОЛ [5].

Во-вторых, среди ТМ встречаются как токсичные для высших растений металлы (Cd, Hg и др.), так и эссенциальные, которые в малых дозах необходимы для жизни растения (Cu, Fe, Ni, Zn и др.); и те, и другие могут вызывать усиление ПОЛ [11–16]. Естественно, их действие зависит от дозы и вида растений [8]. Для меди, например, известно прямое образование АФК через реакции Фентона и Хабер–Вейсса [6], что, в свою очередь, индуцирует ПОЛ, регистрируемое в наших опытах.

В-третьих, имеются данные, что Zn ослабляет интенсивность ПОЛ на фоне меди, понижая уровень МДА; предположительно цинк может стабильно существовать в биологических системах в одновалентном состоянии и тем самым защищать мембранные липиды от АФК [17]. Есть сведения о различных уровнях МДА в растениях *Pisum sativum* при действии одиночных и смешанных ТМ (Cd, Cu, Pb, Zn) [9].

В-четвертых, длительное выращивание растений на растворах, содержащих нелетальные дозы ионов ТМ, может привести к адаптивным изменениям в клетках растений и тем самым снизить реакцию клеточных мембран (регистрируемую по уровню ТБКРС). Вполне вероятно, что ионы Pb^{2+} и Zn^{2+} оказали именно такое воздействие на проростки огурца и редиса, в отличие от ионов меди и никеля.

В связи с вышеизложенным прежние представления об обязательном повышении интенсивности ПОЛ в растениях, подвергнутых действию ТМ, должны быть несколько пересмотрены.

Выявлено, что ионы ТМ индуцировали окислительный стресс в клетках растений огурца и редиса, однако их эффективность как индуцирующих ПОЛ ионов варьировала: если ионы Ni^{2+} и Cu^{2+} оказывали токсическое (хотя и разнонаправленное в концентрационном плане)

воздействие на растения, то ионы Pb^{2+} и Zn^{2+} не вызывали таких эффектов. Более мощное усиление накопления ТБКРС отмечено для растений огурца; по-видимому, растения редиса более устойчивы к действию ТМ. Для растений огурца показано возрастание интенсивности ПОЛ в ряду $Zn^{2+} < Pb^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}$; редиса – $Pb^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Ni^{2+}$. Это говорит о некоторой специфичности реакции растений на определенные ТМ и их концентрации.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России (проект № 6.783.2014К).

Список литературы

1. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа : Гилем, 2001. 161 с.
2. Бармаков Д. И., Лукаткин А. С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений / под ред. А. С. Лукаткина. Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2009. 236 с.
3. Ерофеева Е. А., Наумова М. М. Влияние сульфата кадмия в широком диапазоне концентраций на физиолого-биохимические показатели проростков пшеницы // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 508–512.
4. Курганова Л. Н., Балалаева И. В., Веселов А. П., Сунцины Ю. В., Васильева Е. А., Цыганова М. И. Проксидантно-антиоксидантный статус хлоропластов гороха при действии стрессирующих абиотических факторов среды : 1. Продукция активных форм кислорода и липопероксидация // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 544–549.
5. Anjum N.A., Sofo A., Scopa A., Roychoudhury A., Gill S. S., Iqbal M., Lukatkin A. S., Pereira E., Duarte A. C., Ahmad I. Lipids and proteins – major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants // *Envir. Sci. Pol. Res.* 2015. Vol. 22, № 6. P. 4099–4121.
6. Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
7. Anjum N. A., Umar S., Iqbal M., Khan N. A. Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbate–glutathione cycle metabolism // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. Vol. 58, № 1. P. 92–99.
8. Sytar O., Kumar A., Latowski D., Kuczynska P., Strzalka K., Prasad M. N. V. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants // *Acta Physiol. Plant.* 2013. Vol. 35, № 4. P. 985–999.
9. Malecka A., Piechalak A., Zielinska B., Kutrowska A., Tomaszewska B. Response of the pea roots defense systems



- to the two-element combinations of metals (Cu, Zn, Cd, Pb) // *Acta Biochim. Pol.* 2014. Vol. 61, № 1. P. 23–28.
10. Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // *Физиология растений.* 2002. Т. 49, № 5. С. 697–702.
 11. Cuipers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A. R., Munters E., Artois T. J., Nawrot T., Vangronsveld J., Smeets K. Cadmium stress : an oxidative challenge // *Biometals.* 2010. Vol. 23, № 5. P. 927–940.
 12. Thounaojam T. C., Panda P., Mazumdar P., Kumar D., Sharma G., Sahoo L., Panda S. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice // *Plant Physiol. Biochem.* 2012. Vol. 53, № 1. P. 33–39.
 13. Maldonado-Magana A., Favela-Torres E., Rivera-Cabrera F., Vlke-Sepulveda T. L. Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production // *Plant Soil.* 2011. Vol. 339, № 1–2. P. 377–389.
 14. Gajewska E., Bernat P., Dlugonski J., Sklodowska M. Effect of nickel on membrane integrity, lipid peroxidation and fatty acid composition in wheat seedlings // *J. Agron. Crop Sci.* 2012. Vol. 198, № 4. P. 286–294.
 15. Tewari R. K., Sharma P. N., Bisht S. S. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt // *Plant Sci.* 2002. Vol. 162, № 3. P. 381–388.
 16. Sofo A., Vitti A., Nuzzaki M., Tataranni G., Scopa A., Vangronsveld J., Remans T., Falasca G., Altamura M. M., Degola F., di Toppi L. S. Correlation between hormonal homeostasis and morphogenic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings growing in a Cd/Cu/Zn multi-pollution context // *Physiol. Plant.* 2013. Vol. 149, № 4. P. 487–498.
 17. Teisseire H., Guy V. Copper-induced changes in antioxidants enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*) // *Plant Sci.* 2000. Vol. 153, № 1. P. 65–72.