

ЗМІНА БІОХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ *BARBULA UNGUICULATA* HEDW. І *BRYUM CAESPITICIMUM* HEDW. ПІД ВПЛИВОМ ГІПЕРТЕРМІЇ НА ПОСТТЕХНОГЕННИХ ТЕРИТОРІЯХ ВИДОБУТКУ СІРКИ

ОКСАНА ЛЬВІВНА БАЇК

БАЙК О.Л. Зміна біохімічних параметрів *Barbula unguiculata* Hedw. і *Bryum caespitium* Hedw. під впливом гіпертермії на посттехногенних територіях видобутку сірки // Наукові основи збереження біотичної різноманітності. – 2015. – Том 6(13), № 1. – С. 277-292. – ISSN 2220-3087.

Проаналізовані активність, термостабільність та електрофоретичний спектр кислих розчинних білків і множинних молекулярних форм пероксидази та супероксиддисмутази (СОД) *Barbula unguiculata* Hedw. і *Bryum caespitium* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки у літній та осінній сезони. Установлена залежність активності антиоксидантних ферментів у досліджених мохів від інтенсивності освітлення та температури на трансектах відвалу № 1. У літній період відзначено найбільші показники активності пероксидази та СОД у зразках мохів з північної вершини відвалу, де вплив високих температур та інтенсивності освітлення особливо відчутний.

В умовах експерименту, у *B. unguiculata* та *B. caespitium* з північної вершини відвалу під впливом 24-годинної дії температури 42 °С встановлено найістотніше збільшення активності пероксидази в 1,2-1,4 та СОД в 1,6-1,9 рази. За дії гіпертермії, термостабільність пероксидази та СОД мохів з цього місцевиростання також найістотніше збільшувалися в 1,8-1,4 рази відповідно. Збільшення активності та термостабільності пероксидази дослідних зразків мохів *B. unguiculata* та *B. caespitium* після дії високої температури супроводжувалося змінами інтенсивності високомолекулярних і появою низькомолекулярних фракцій в електрофоретичних спектрах кислих розчинних білків, множинних молекулярних форм пероксидази та СОД. Збільшення активності пероксидази та СОД, як і підвищення їх термостабільності, спричинені гіпертермією, нівелювалися попередньою обробкою інгібітором біосинтезу білка циклогексамідом (ЦГ), що може свідчити про участь білоксинтезуючої системи в цьому процесі.

Підвищення активності й термостабільності ферментів-антиоксидантів, мінливість низькомолекулярних фракцій кислих розчинних білків і ферментів зумовлена, насамперед, зміною експресії генів стресових білків, що контролюють синтез специфічних адаптогенів і протекторів. Отримані результати свідчать про те, що екстремальні умови антропогенно трансформованого середовища сприяють розвиткові форм з найбільшими потенційними можливостями.

Ключові слова: мохи, активність та термостабільність антиоксидантних ферментів, пероксидаза, супероксиддисмутаза, електрофоретичний спектр, кислі розчинні білки, множинні молекулярні форми ферментів

Вивчення впливу екологічних стресорів на рослини – одна з найактуальніших проблем сучасної біології. Інтенсивне техногенне навантаження надають цим питанням особливого значення, оскільки можуть призвести до масштабних екологічних змін, негативно вплинути на біорізноманіття. Екологічними наслідками

видобутку корисних копалин, у тому числі й сірки, є руйнування ґрунтів, порушення рельєфу, зміни мікроклімату, погіршення умов життя рослин і тварин.

Дія різних абіотичних факторів, таких як посуха, засоленість, температурний стрес (особливо у літні місяці), підвищена інсоляція, сильні вітри, може призвести до активації захисних і пристосувальних реакцій рослин. Адаптація рослин контролюється складною молекулярно-генетичною системою, яка індукує певний стрес-реагуючий механізм, що забезпечує підтримання гомеостазу рослинного організму та захищає від руйнування молекулярної і структурної організації клітин (Пятыгин, 2008). Основні адаптивні зміни в рослин відбуваються на морфологічному та, насамперед, на біохімічному рівнях (Beck, Lüttge, 1990). Стійкість рослин до абіотичних стресорів пов'язана з експресією генів, які беруть участь у сигнальних або регуляторних системах, у запуску синтезу стресових білків і метаболітів (Rampitsch, Srinivasan, 2006; Юрина, Одинцова, 2007).

Температура є одним із найважливіших факторів середовища, що контролює онтогенез рослинних організмів. Нині основна увага акцентується на вивченні біохімічних і молекулярно-генетичних аспектів стійкості рослин до стресових температур (Vij, Tyagi, 2007; Wahid, Close, 2007).

У ході адаптації рослин до високих температур підвищується термостабільність клітин, що значною мірою пов'язано зі зміною термостабільності білків і ферментів. Є припущення про участь індукованого білкового синтезу у формуванні терморезистентності (Karpets, Kolupaev, 2008).

Температурний вплив є одним із потужних абіотичних чинників середовища на рослинний організм. Актуальними нині є дослідження стійкості рослин до несприятливих температур, яка є результатом фізіолого-біохімічних перетворень. У стійкості рослин до дії стрес-факторів значну роль відіграють неспецифічні захисні системи, зокрема антиоксидантна система. Антиоксидантний комплекс, що складається з ферментних і низькомолекулярних антиоксидантів, належить до стрес-протекторних систем, задіяних у формуванні стійкості рослин, у тому числі й до гіпертермії (Helena, Carvalho, 2008; Fan et al., 2009; Колупаев, Карпец, 2010; Обозный и др., 2012).

Матеріали та методика досліджень

Об'єктами досліджень були бріофіти (відділ Bryophyta) *Barbula unguiculata* Hedw. і *Bryum caespiticium* Hedw. девастрованих територій Язівського родовища сірки (Львівська обл., Яворівський р-н, площа 20 км²), яке підпорядковане Новояворівському ДП “Екотрансенерго”.

Визначення інтенсивності освітлення. Інтенсивність освітлення на дослідних ділянках вимірювали люксометром Ю-116.

Визначення активності пероксидази. Наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,1 М ацетатному буфері (рН 5,4) у співвідношенні 1:1, екстра-

гували протягом 30 хв за кімнатної температури та центрифугували 15 хв, 4000 об/хв. Супернатант використовували як ферментний препарат. Для визначення активності пероксидази 2 мл ферментного препарату змішували з 0,5% розчином бензидину та 0,1 М ацетатним буфером (рН 5,4). Якісну реакцію розпочинали внесенням 3% розчину пероксиду водню. Через 5 хв проби фотометрували за довжини хвилі 412 нм. Активність ферменту визначали у відносних одиницях на 1 г сирової маси (Методы... ,1987).

Визначення активності супероксиддисмутази (СОД). Для визначення активності СОД рослинний матеріал екстрагували протягом 30 хв у 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8). 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 феназинметасульфат 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 (Чевари, Андял, Штренгер, 1991).

Для визначення термостабільності пероксидази та СОД гаметофори мохів витримували впродовж 24 годин за температури +42 °С у термостаті. Термостабільність розраховували як відношення значення залишкової активності ферменту після прогрівання зразків у термостаті до її значення за кімнатної температури ($t = +20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Частину рослинного матеріалу протягом 1 доби інкубували на розчині інгібітора біосинтезу білка циклогексиміду (ЦГ). Концентрація ЦГ (20 мкМ) практично повністю нівелювала підвищення активності та термостійкості ферментів досліджуваних мохів за дії сублетальної температури.

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда (Bredford, 1976).

Електрофоретичний аналіз білків та множинних молекулярних форм ферментів. Свіжий зелений матеріал розтирали в охолодженому до 4 °С трис-гліциновому буфері (рН = 8,3), додаючи захисні агенти (100 мг трилону Б, 400 мг аскорбінової кислоти на 8 мл буфера та 0,06 мл меркаптоетанолу; співвідношення рослинного матеріалу до буфера – 1:1). Одержану масу центрифугували за 3000 об/хв. До супернатанту додавали 70%-ний розчин сахарози в розрахунку 0,2 мл на 1 мл екстракту (Taylor, Eppley, Jesson, 1970).

Супернатант, який містив 50-250 мкг білка, наносили на поверхню гелю в електрофоретичних стовпчиках об'ємом до 0,25 мл. Уміст білка визначали за методом О.А. Лоурі (Lowry et al., 1951). Електрофоретичне розділення білків проводили за методикою Сафонових (Методы..., 1987) за сили струму на трубку 4 мА і температури 4 °С. Електрофореграми фарбували Кумасі блакитним. Для виявлення пероксидаз застосовували інкубаційне середовище з бензидином, а супероксиддисмутази (СОД) виявляли за допомогою нітросинього тетразолію за методикою Р.Т. Шора та Е.В. Баура (Методы..., 1987).

Результати досліджень та їх обговорення

Одними з центральних ферментів у дослідженні механізмів адаптації є ізоформи пероксидаз, які належать до надзвичайно лабільних і поліфункціональних “стресових” ферментів. Установлена залежність активності пероксидази *Barbula unguiculata* та *Bryum caespiticium* з різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина) від інтенсивності освітлення та температури. Особливо вирізняється активність пероксидази обох домінантних видів мохів у літній період за високої температури 35,0-37,5 °С та інтенсивності освітлення 110 тис. лк на північній вершині та північному схилі відвалу, порівняно з основою. Так, активність пероксидази в *B. unguiculata* була найбільшою у зразків з північної вершини відвалу та становила $23,8 \pm 0,3$ (відн. од./г с. м.), тобто приблизно в 1,2 рази більшою, ніж в основі відвалу ($20,0 \pm 0,4$ відн. од./г с. м.) (рис. 1).

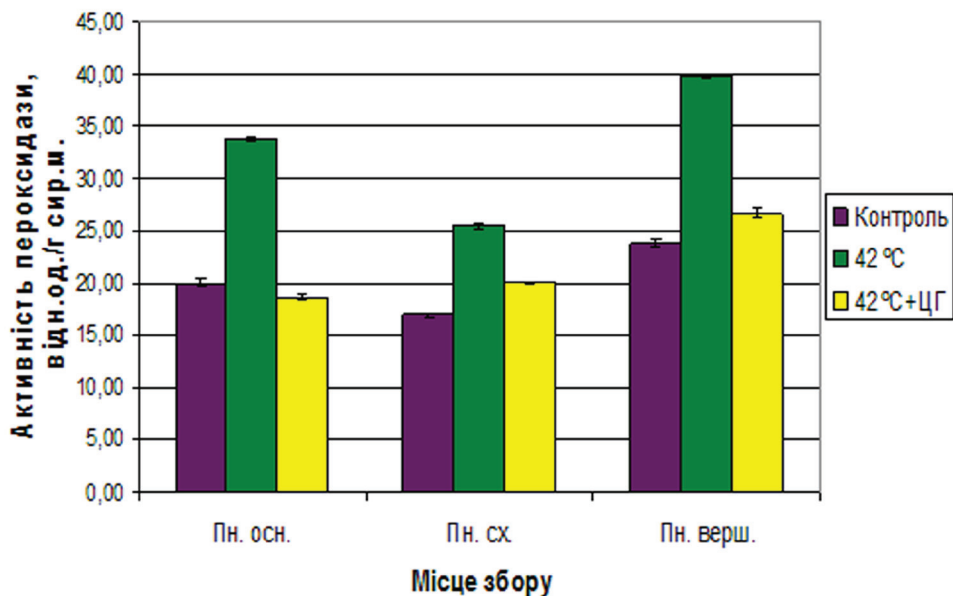


Рис. 1. Активність пероксидази (відн. од./г сирої маси) *Barbula unguiculata* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина).

Показники активності пероксидази в *B. caespiticium* були також найбільшими на північній експозиції (вершина та схил) відвалу та становили $20,9 \pm 0,2$ та $24,7 \pm 0,2$ (відн. од./г с. м.) відповідно, тобто в 1,2-1,4 рази більше, ніж в основі відвалу (рис. 2). Восени, коли температурний ($t = +14$ °C) та інсоляційний (≈ 80 тис. лк) рівні зменшувалися, активність пероксидази обох видів з усіх місцевиростань також дещо зменшувалася, хоча найбільші значення ак-

тивності ферменту на вершині відвалу зберігалися. Зразки *B. unguiculata* та *B. caespiticiu*m, зібрані з дослідних трансект, використовували для подальших експериментальних досліджень.

Установлено підвищення активності та термостабільності пероксидази за дії гіпертермії у *B. unguiculata* та *B. caespiticiu*m. Так, активність пероксидази у зразках *B. unguiculata* з усіх трансект збільшувалася в 1,5-1,7 рази (рис. 1), а у *B. caespiticiu*m приблизно в 1,8 рази (рис. 2). Найбільшу активність пероксидази за 24-годинної дії температури 42 °С спостерігали у зразках *B. unguiculata* з північної вершини відвалу ($39,8 \pm 0,2$ відн. од./г с. м.). Натомість, у *B. caespiticiu*m за температурного стресу найбільшими були показники активності пероксидази у зразках із північного схилу та північної вершини: $44,7 \pm 0,2$ та $37,3 \pm 0,2$ відн. од./г с. м.

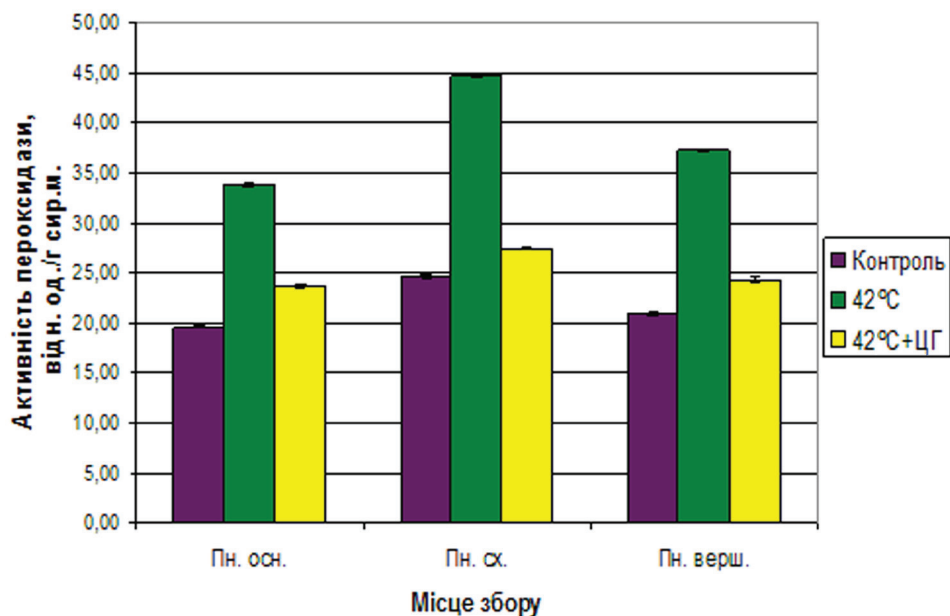


Рис. 2. Активність пероксидази (відн. од./г сирої маси) *Bryum caespiticiu* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина).

Відомо, що під час адаптації рослин до гіпертермії відбувається зміна не лише активності, а й кінетичних характеристик багатьох ферментів, у тому числі пероксидази (Александров, 1985; Лютова, Каменцева, 2001; Обозный и др., 2010). Виявлено відмінності термостабільності пероксидази мохів *B. unguiculata* та *B. caespiticiu*m з дослідних трансект відвалу під впливом гіпертермії. Найбільшою була термостабільність пероксидази за дії гіпертермії у зразках *B. unguiculata* з вершини ($0,67 \pm 0,04$ відн. од.) та основи відвалу

($0,69 \pm 0,05$ відн. од.) (рис. 3), а у *B. caespiticium* зі схилу ($0,81 \pm 0,05$ відн. од.) і вершини відвалу ($0,78 \pm 0,03$ відн. од.), де відзначено найбільшу напруженість екологічних факторів (рис. 4).

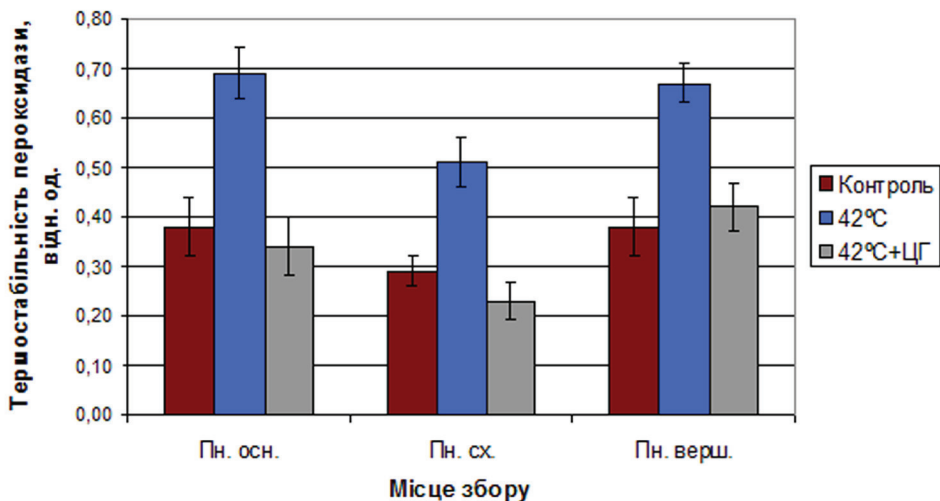


Рис. 3. Термостабільність пероксидази (відн. од.) *Barbula unguiculata* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина).

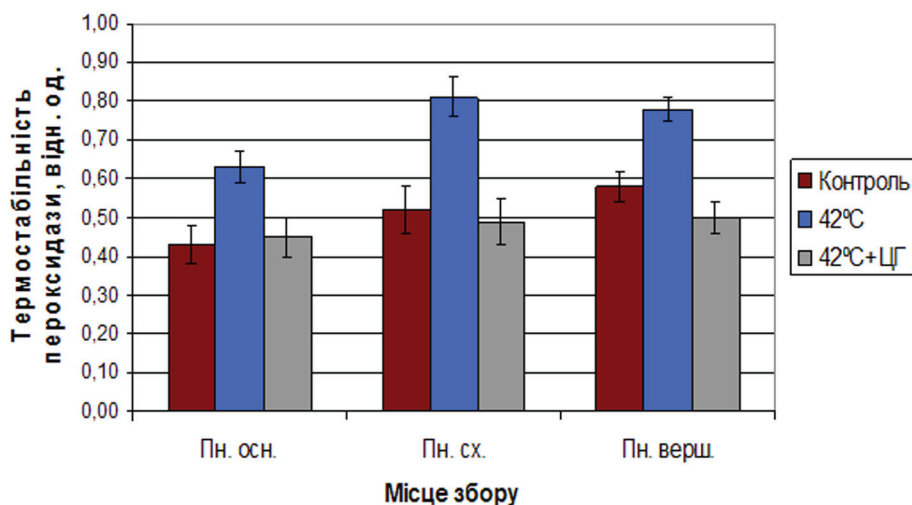


Рис. 4. Термостабільність пероксидази (відн. од.) *Bryum caespiticium* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина).

Збільшення активності пероксидази, як і збільшення її термостабільності, спричинені 24-годинною дією температури +42 °С, усувалися попередньою обробкою інгібітором біосинтезу білка циклогексамідом (ЦГ). Очевидно, збільшення термостабільності пероксидази пов'язане з посиленням синтезу її термостабільніших молекулярних форм, яке нівелювалось ЦГ. Такі результати можуть свідчити про участь білоксинтезуючої системи у збільшенні термостабільності, зумовленої гіпертермією. Збільшення активності та термостабільності пероксидази дослідних зразків мохів *B. unguiculata* та *B. caespiticiu* після дії температури супроводжувалося змінами електрофоретичних спектрів множинних молекулярних форм пероксидази та кислих розчинних білків. Отримані результати свідчать, що збільшення термостабільності пероксидази мохів пов'язане зі змінами ізоферментного складу. Найістотніші зміни спектру множинних молекулярних форм пероксидази відзначали в мохів з північної вершини та північного схилу відвалу: збільшувалася інтенсивність низькомолекулярних фракцій ферменту з молекулярною масою (ММ) 45 та 66 кД. Окрім цього, у *B. unguiculata* з північної вершини та північного схилу посилилася інтенсивність електрофоретичної смуги ферменту з ММ 66 кД та з'явилася фракція з ММ 132 кД (рис. 5).

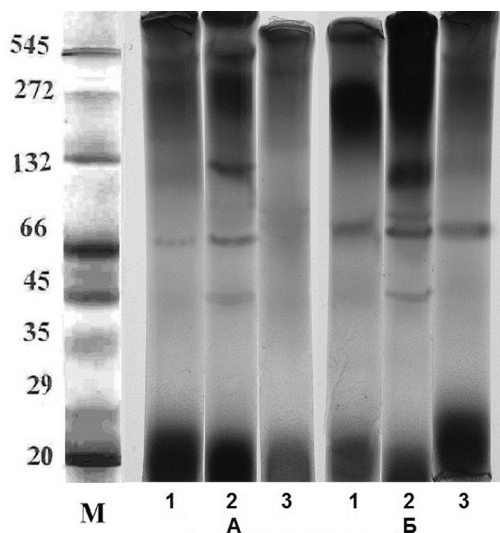


Рис. 5. Електрофоретичний спектр пероксидази *Barbula unguiculata* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: М – маркер; А – схил, Б – вершина; 1 – контроль, 2 – $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 год), 3 – $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C} + \text{ЦГ}$ (20 мкМ) (24 год).

Під впливом гіпертермії у зразках *B. caespiticiu* з північного схилу відвалу з'явилися низькомолекулярні фракції з ММ 45 та 66 кД, а у зразках з північної вершини активізувалася фракція з ММ 45 кД (рис. 6).

Істотних змін за дії гіпертермії зазнавав електрофоретичний спектр кислих розчинних білків. Так, у *B. unguiculata* з північної вершини відзначено посилен-

ня в електрофоретичному спектрі кислих розчинних білків активності смуг з ММ 20 та 66 кД та появу низькомолекулярних фракцій з ММ 29 та 45 кД (рис. 7).

У *B. caespiticius* з північної вершини за дії гіпертермії з'явилися смуги з 29, 75 та 245 кД та активувалася смуга з 272 кД (рис. 8).

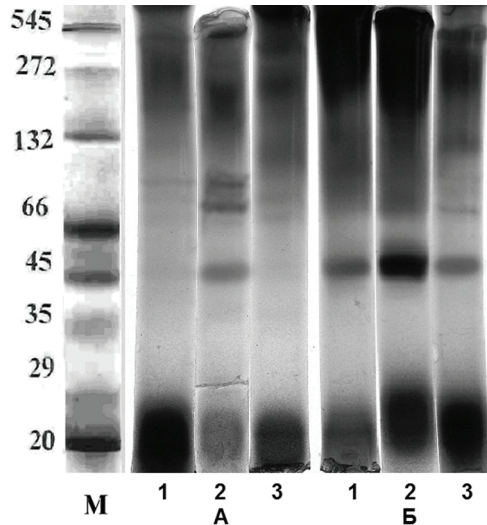


Рис. 6. Електрофоретичний спектр пероксидази *Bryum caespiticius* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: М – маркер; А – схил, Б – вершина; 1 – контроль, 2 – $t = 42^{\circ}\text{C}$ (24 год), 3 – $t = 42^{\circ}\text{C} + \text{ЦГ}$ (20 мкМ) (24 год).

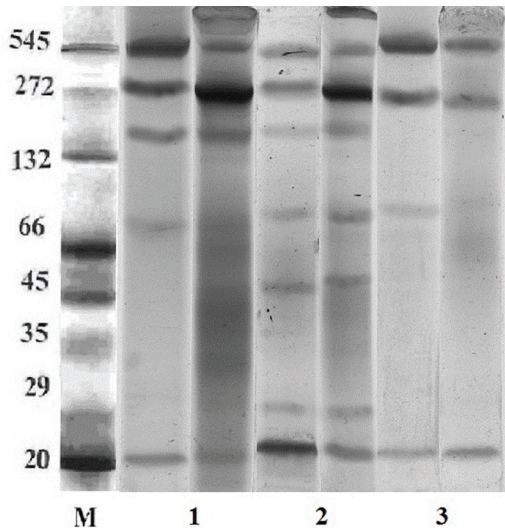


Рис. 7. Електрофоретичний спектр множинних молекулярних форм білків *Barbula unguiculata* Hedw. з північної вершини породного відвалу № 1: М – маркер; 1 – контроль, 2 – $t = 42^{\circ}\text{C}$ (24 год), 3 – $t = 42^{\circ}\text{C} + \text{ЦГ}$ (20 мкМ) (24 год).

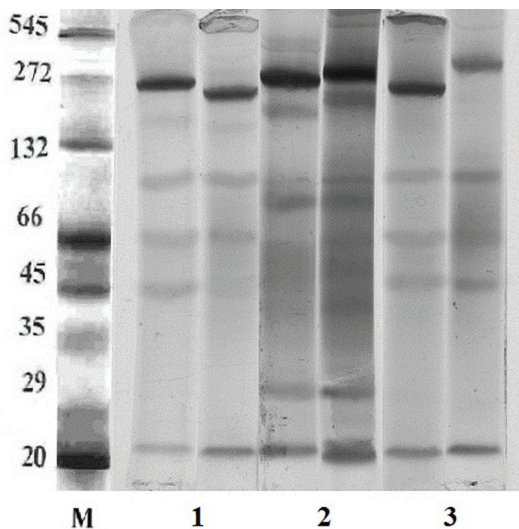


Рис. 8. Електрофоретичний спектр множинних молекулярних форм білків *Bryum caespiticium* Hedw. із північної вершини породного відвалу № 1: М – маркер; 1 – контроль, 2 – $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 год), 3 – $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C} + \text{ЦГ}$ (20 мкМ) (24 год).

Характерно, що ефекти появи та посилення активності окремих ізоформ пероксидази та кислих розчинних білків під впливом гіпертермії нівелювалися інгібітором білкового синтезу ЦГ.

Супероксиддисмутаза (СОД) розглядається не лише як антиоксидантний фермент, а й як компонент сигнальних систем (Колупасєв, Обозний, 2013). Сигнали, що формуються за участю активних форм кисню (АФК), призводять до посилення експресії генів й активації стрес-протекторних систем. Літературні дані свідчать, що у формуванні термостабільності рослин можлива участь індукованого білкового синтезу. Вважається, що гіпертермія спричиняє посилення синтезу більш термостабільних форм ферменту. Показано, що ефект збільшення активності та термостабільності СОД проростків пшениці нівелювався обробкою інгібітором біосинтезу білка ЦГ (Карпець та ін., 2008). Питання щодо впливу високих температур на активність і термостабільність СОД мохів залишається досі не дослідженим.

Проаналізована активність, термостабільність та електрофоретичний спектр СОД у пагонах *B. unguiculata* та *B. caespiticium* з різних трансект відвалу № 1 видобутку сірки (плато, північний схил і північна вершина) у літньо-осінній період. З'ясовано, що активність СОД досліджених мохів залежить від інтенсивності освітлення та температури на трансектах відвалу № 1. Особливо вирізняється активність СОД у літній період за високої температури 32-34 °C та інтенсивності освітлення 100-110 тис. лк. Так, активність СОД у цей період на північному схилі й плато відвалу в *B. unguiculata* ста-

новила $9,4 \pm 0,3$ та $9,7 \pm 0,2$ (відн. од./хв мг/білка), відповідно, і була, приблизно, в 1,2 рази більшою, ніж на північній вершині відвалу (контроль) (рис. 9). Натомість, у *B. caespitium* більші показники активності СОД відзначено на північній вершині та плато відвалу: $9,1 \pm 0,3$ та $9,8 \pm 0,3$ (відн. од./хв мг/білка) відповідно (контроль) (рис. 10). Восени, коли температурні ($t = +14^\circ\text{C}$) та інсоляційні (80 тис. лк) показники зменшувалися, активність СОД обох видів з усіх місцевиростань також дещо зменшувалася.

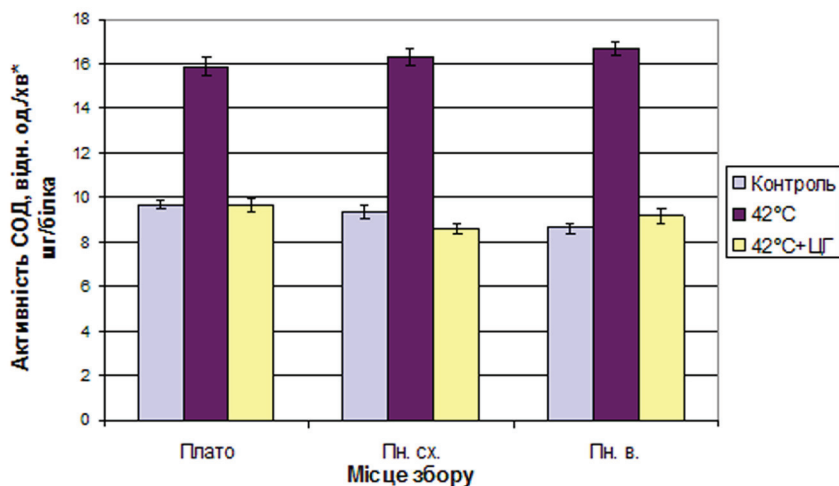


Рис. 9. Активність СОД (відн. од./хв мг/білка) *Barbula unguiculata* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (плато, схил і вершина).

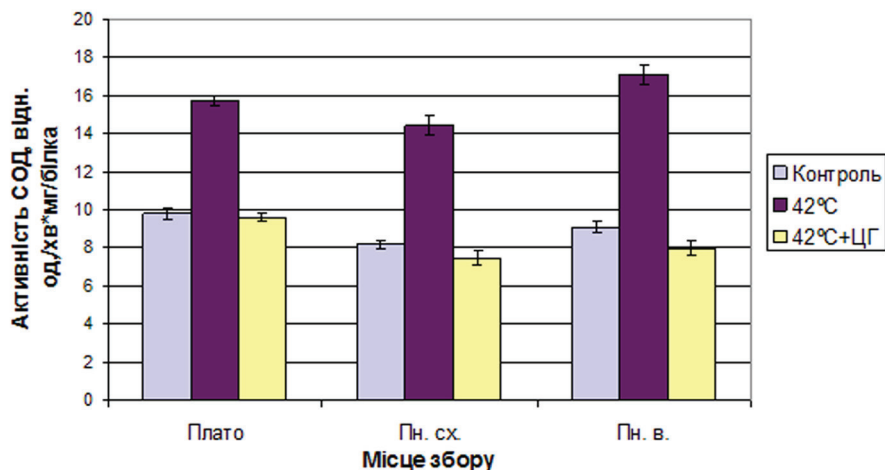


Рис. 10. Активність СОД (відн. од./хв мг/білка) *Bryum caespitium* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (плато, схил і вершина).

В умовах експерименту встановлено збільшення активності СОД у *B. unguiculata* та *B. caespiticiu*m в 1,6-1,9 рази під впливом 24-годинної дії температури 42 °С. Найістотніше збільшення активності СОД виявлено в мохів з північної вершини відвалу: $16,7 \pm 0,3$ та $17,1 \pm 0,5$ (відн. од./хв мг/білка) відповідно (рис. 9, 10).

Термостабільність СОД була найвищою у зразках мохів з північного схилу та північної вершини відвалу за великих показників температурного та інсоляційного режимів, особливо в літній період. Так, термостабільність за дії гіпертермії у *B. unguiculata* з цих трансект становила $0,74 \pm 0,03$ відн. од. та $0,93 \pm 0,05$ відн. од. та у *B. caespiticiu*m $0,76 \pm 0,05$ відн. од. та $0,88 \pm 0,04$ відн. од. відповідно (рис. 11, 12).

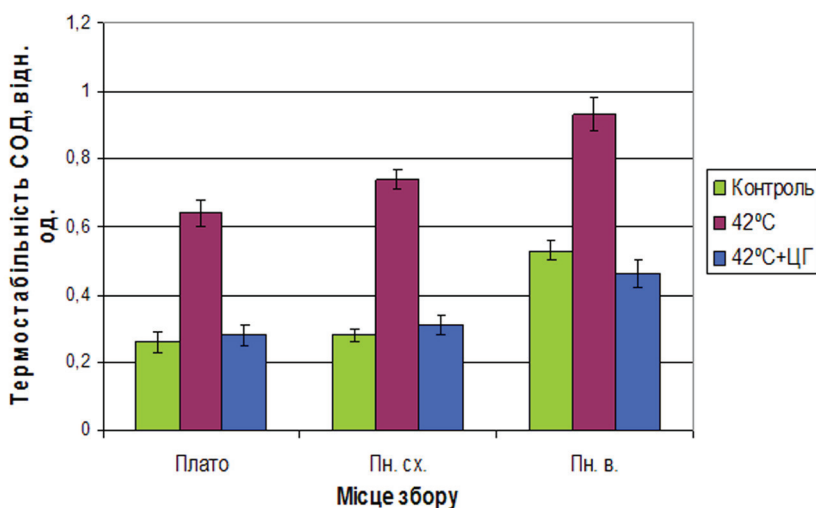


Рис. 11. Термостабільність СОД (відн. од.) *Barbula unguiculata* Hedw. із різних трансект відвалу № 1 видобутку сірки (плато, північний схил і північна вершина).

Найістотніші зміни електрофоретичного спектру СОД відзначали в мохів з північної вершини відвалу. Зокрема, у *B. unguiculata* під впливом 24-годинної дії температури 42 °С з'явилася низькомолекулярна фракція СОД з ММ 29 кД у зразках з плато та північної вершини (рис. 13), а у *B. caespiticiu*m – окрім цього, зникла високомолекулярна фракція з ММ 272 кД. У *B. caespiticiu*m з північної вершини відвалу з'явилася ще ізоформа СОД з ММ 35 кД (рис. 14).

Показано, що ефекти появи низькомолекулярних фракцій та зникнення високомолекулярних фракцій СОД нівелювалися обробкою гаметофорів мохів ЦГ. На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що антиоксидантні ферменти, зокрема пероксидаза та СОД, зумовлюють формування терморезистентності мохів на посттехногенних територіях видобутку сірки.

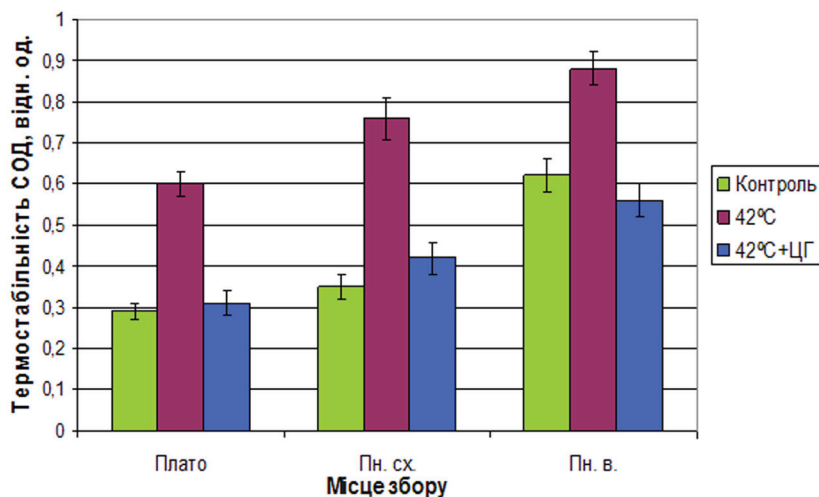


Рис. 12. Термостабільність СОД (відн. од.) *Bryum caespiticium* Hedw. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (плато, схил і вершина).

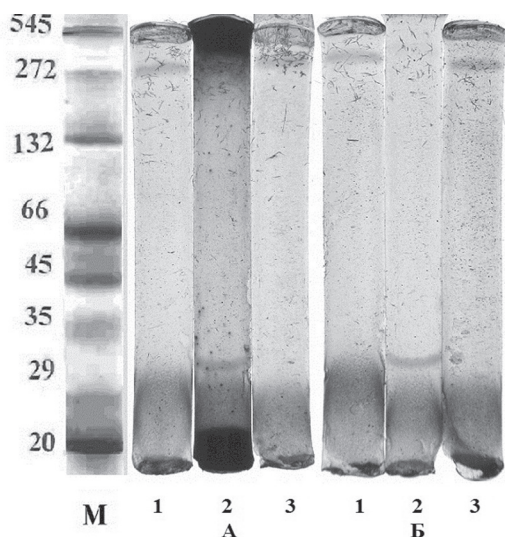


Рис. 13. Електрофоретичний спектр СОД *Barbula unguiculata* Hedw. із територій відвалу № 1 видобутку сірки: М – маркер; А – плато, Б – північна вершина; 1 – контроль, 2 – $t = 42^\circ\text{C}$ (24 год), 3 – $t = 42^\circ\text{C} + \text{ЦГ}$ (20 мкМ) (24 год).

Такі ефекти, очевидно, пов'язані з посиленням синтезу термостабільніших форм ферментів. В активації їх синтезу, імовірно, беруть участь АФК, генерація яких тимчасово посилюється внаслідок дії високої температури (Карпець та ін., 2008; Карпець, Колупасєв, 2008; Колупасєв, Обозный, 2013). Ефект збільшен-

ня активності та термостабільності СОД, спричинений впливом гіпертермії, нівелювався обробкою гаметофорів досліджених зразків мохів інгібітором біосинтезу білка циклогексимідом (ЦГ). Отримані результати свідчать про можливість індукованого гіпертермією біосинтезу термостабільних форм СОД.

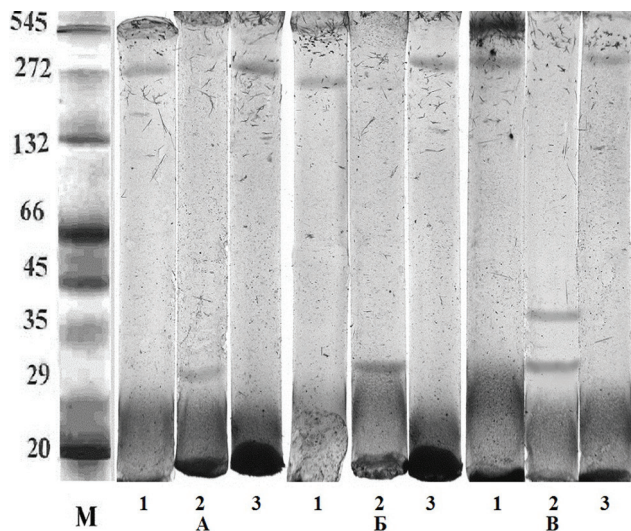


Рис. 14. Електрофоретичний спектр СОД *Bryum caespiticiu* Hedw. із територій відвалу № 1 видобутку сірки: М – маркер; А – плато, Б – північний схил, В – північна вершина; 1 – контроль, 2 – $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 год), 3 – $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C} + \text{ЦГ}$ (20 мкМ) (24 год).

Висновки

На підставі проведених досліджень можна припустити, що вплив високої температури супроводжувався появою термостабільніших молекулярних форм пероксидази та білків. Ефект збільшення термостабільності ферменту можна розглядати як механізм адаптації білоксинтезуючої системи до дії високих температур. Збільшення активності й термостабільності ферментів-антиоксидантів і мінливість низькомолекулярних фракцій кислих розчинних білків і ферментів зумовлені, насамперед, зміною експресії генів стресових білків, що контролюють синтез специфічних адаптогенів і протекторів, свідчать про те, що екстремальні умови антропогенно трансформованого середовища сприяють розвитку форм організмів з найвищими потенційними можливостями.

АЛЕКСАНДРОВ В.Я. Реактивность клеток и белки. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.

КАРПЕЦЬ Ю.В., ОБОЗНИЙ О.І., ВАЙНЕР А.О., КОЦ Г.П. Підвищення термостабільності

- супероксиддисмутази в корнях пшениці після короткочасного теплового загартування: значення біосинтезу білка і активних форм кисню // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер: Біологія. – 2008. – Вип. 3(15). – С. 41-45.
- КАРПЕЦЬ Ю.В., КОЛУПАЕВ Ю.Є. Значення окиснювального стресу в індукованні теплостійкості проростків пшениці короткочасною дією сублетальної температури // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – 40, № 3. – С. 245-252.
- КОЛУПАЕВ Ю.Е., КАРПЕЦЬ Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – К.: Основа, 2010. – 352 с.
- КОЛУПАЕВ Ю.Є., ОБОЗНИЙ О.І. Активні форми кисню і антиоксидантна система при перекресній адаптації рослин до дії абіотичних стресорів // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер: Біологія. – 2013. – Вип. 3(30). – С. 18-31.
- ЛЮТОВА М.И., КАМЕНЦЕВА И.Е. Термоиндуцированное увеличение устойчивости нитратредуктазы из листьев пшеницы к инактивирующим воздействиям // Физиология растений. – 2001. – 48, № 1. – С. 100-105.
- Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. 3-е изд., переработанное и дополненное. – Ленинград: Агропромиздат, 1987. – 325 с.
- ОБОЗНИЙ А.И., ЯСТРЕБ Т.О., КОЛУПАЕВ Ю.Е., ПОПОВ В.Н., КРИВОРУЧКО Р.В. Влияние кратковременного нагрева на активность и термостабильность растворимой пероксидазы корней пшеницы разных экотипов // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер: Біологія. – 2010. – Вип. 2(20). – С. 61-68.
- ОБОЗНИЙ А.И., КОЛУПАЕВ Ю.Е., ШВИДЕНКО Н.В., ВАЙНЕР А.А. Динамика активности антиоксидантных ферментов при кросс-адаптации проростков пшеницы к гипертермии и осмотическому шоку // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер: Біологія. – 2012. – Вип. 2(26). – С. 71-84.
- ПЯТЫГИН С.С. Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общей биологии. – 2008. – Т. 69, № 4. – С. 294-298.
- ЧЕВАРИ С., АНДЯЛ Т., ШТРЕНГЕР Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. – 1991. – С. 9-13.
- ЮРИНА Н.П., ОДИНЦОВА М.С. Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 4. – С. 485-498.
- BECK E., LÜTTGE U. Streß bei Pflanzen Biol. // Unserer Zeit. – 1990. – Bd. 20. – S. 237-244.
- BREDFORD W. A simple method for protein test // Annal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 248-252.
- FAN X.W., LI F.M., SONG L., XIONG Y.C., AN L.Z., JIA Y. Defense strategy of old and modern spring wheat varieties during soil drying // Physiol. Plant. – 2009. – Vol. 136. – P. 310-323.
- HELENA M., CALVALHO C. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling // Plant Signal Behav. – 2008. – Vol. 3. – P. 156-165.
- KARPETS Y.V., KOLUPAEV Y.Y. The participation of reactive oxygen species in the plants heat resistance induction at the short-term hardening by superoptimum temperatures / Materials Int. Conf. "Bioecological problems and means of solution" (May 15-18. – 2008. Saransk. Russia). – Saransk, 2008. – P. 202-203.
- LOWRY O.A., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem., 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.

- RAMPITSCH CH., SRINIVASAN H. The application of proteomics to plant biology: a review // Can. J. Bot. – 2006. – Vol. 84. – P. 883-892.
- TAYLOR P.J., EPPLEY S.M., JESSON L.K. Sporophytic inbreeding depression in mosses occurs in a species with separate sexes but not in a species with combined sexes // Amer. J. Bot. – 2007. – 94(11). – P. 1853-1859.
- VII S., TYAGI A.K. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants // Plant Biotech. J. – 2007. – Vol. 5, № 3. – P. 361-380.
- WAHID A., CLOSE T.J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves // Biol. Plant. – 2007. – Vol. 51. – P. 104-109.

ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ *BARBULA UNGUICULATA* HEDW. И *BRYUM CAESPITICIMUM* HEDW. ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПЕРТЕРМИИ НА ПОСТТЕХНОГЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ДОБЫЧИ СЕРЫ

О.Л. БАИК

Проанализированы активность, термостабильность и электрофоретический спектр кислых растворимых белков и множественных молекулярных форм пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД) *Barbula unguiculata* Hedw. и *Bryum caespiticium* Hedw. с разных трансект северной экспозиции отвала № 1 добычи серы в летний и осенний сезоны. Выявлена зависимость активности антиоксидантных ферментов изученных мхов от интенсивности освещения и температуры на трансектах отвала № 1. В летний период отмечены наиболее высокие показатели активности пероксидазы и СОД в образцах мхов с северной вершины отвала, где влияние высоких температуры и интенсивности освещения особенно выражены.

В условиях эксперимента у *B. unguiculata* и *B. caespiticium* с северной вершины отвала под 24-часовым действием температуры 42 °С выявлено наибольшее увеличение активности пероксидазы в 1,2-1,4 и СОД в 1,6-1,9 раза. Под действием гипертермии термостабильность пероксидазы и СОД мхов из этого местопроизрастания в условиях эксперимента также существенно увеличивалось в 1,8-1,4 раза соответственно. Повышение активности и термостабильности пероксидазы исследованных образцов мхов *B. unguiculata* и *B. caespiticium* после действия высоких температур сопровождалось изменениями интенсивности высокомолекулярных и появлением низкомолекулярных фракций в электрофоретических спектрах кислых растворимых белков, множественных молекулярных форм пероксидазы и СОД. Увеличение активности пероксидазы и СОД, как и повышение их термостабильности, обусловленные гипертермией, нивелировались предварительной обработкой ингибитором белкового синтеза циклогексимидом (ЦГ), что может свидетельствовать об участии белоксинтезирующей системы в этом процессе.

Повышение активности и термостабильности ферментов-антиоксидантов, изменчивость низкомолекулярных фракций кислых растворимых белков и ферментов обусловлены, в первую очередь, изменением экспрессии генов стрессовых белков, которые контролируют синтез специфических адаптогенов и протекторов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстремальные условия антропогенно трансформированной среды способствуют развитию форм с наиболее высокими потенциальными возможностями.

Ключевые слова мхи, активность и термостабильность антиоксидантных ферментов, пероксидаза, супероксиддисмутаза, электрофоретический спектр, кислые растворимые белки, множественные молекулярные формы ферментов

CHANGES OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *BARBULA UNGUICULATA* HEDW. AND *BRYUM CAESPITICIUM* HEDW. UNDER THE INFLUENCE OF HYPERTHERMIA ON POSTTECHNOGENIC TERRITORIES OF SULPHUR MINING

O.L. BAIK

The activity, thermal stability and electrophoretic spectrum of acidic soluble proteins and multiple molecular forms of peroxidase and SOD in shoots of mosses *Barbula unguiculata* Hedw. and *Bryum caespiticiu*m Hedw. from different transects of the northern exposure on the dump 1 of Novoyavorivsk State Mining and Chemical Enterprise "Sirka" of sulfur extraction in the summer and autumn seasons were analyzed. The dependence of the antioxidant enzymes activity in investigated mosses on light intensity and temperature on the transect of dump 1 was established. During the summer period the highest rates of peroxidase and SOD activity in samples of mosses from the northern peak of the dump, where the effect of high temperatures and light intensity is particularly significant, were marked.

Under the experimental conditions in *B. unguiculata* and *B. caespiticiu*m from the northern peak of the dump affected by 24-hour high temperature (42 °C) the most significant increase in peroxidase activity in 1.2-1.4 and SOD in 1.6-1.9 times was set. Thermal stability of peroxidase and SOD in mosses of this location affected by hyperthermia also increased significantly in 1.8-1.4 times respectively.

The increase in activity and thermal stability of peroxidase in samples of mosses *B. unguiculata* and *B. caespiticiu*m after high temperature impact was accompanied by changes in the intensity of high and low molecular weight fractions and appearance of electrophoretic spectra of acidic soluble proteins from the MW 29 and 45 kDa in *B. unguiculata* and MW 29 and 75 kDa in *B. caespiticiu*m. The electrophoretic spectrum of multiple molecular forms of peroxidase and SOD affected by hyperthermia also significantly changed. In *B. unguiculata* intensity of peroxidase fraction of the MW 66 kDa increased and a fraction of the MW 132 kDa appeared, and in *B. caespiticiu*m low MW fractions of 45 and 66 kDa appeared. SOD spectrum in *B. unguiculata* significantly changed: a low-molecular fraction of SOD with MW 29 kDa in samples from the northern plateau and peak appeared, while in *B. caespiticiu*m – SOD isoform with MW 35 kDa.

The increased activities of SOD and peroxidase, as well as improving of their thermal stability and changes in electrophoretic spectra caused by hyperthermia, were leveled by pre-treatment with protein biosynthesis inhibitor cycloheximide, and can indicate the involvement of protein synthesis system in this process.

Increase in activity and thermal stability of antioxidant enzymes, variability of low molecular fractions of acidic soluble proteins and enzymes were caused primarily due to changes in gene expression of stress proteins that control the synthesis of specific adaptogens and protectors. The obtained results show that extreme conditions of anthropogenically transformed environment promote the development of forms with the highest potential.

Key words: mosses, activity and thermal stability of antioxidative enzymes, peroxidase, superoxide dismutase, electrophoretic spectrum, acidic soluble proteins, multiple molecular forms of enzymes

Надійшла 22.10.2015

Прийнята до друку 24.12.2015

БАІК О.Л. Інститут екології Карпат НАН України, вул. Козельницька, 4, м. Львів, 79026, Україна; e-mail: ecomorphogenesis@gmail.com

BAIK O.L. Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine, 4, Kozelnytska St, Lviv, 79026, Ukraine; e-mail: ecomorphogenesis@gmail.com