

БІОХІМІЧНА МІНЛИВІСТЬ МОХУ *BRYUM CAESPITICIMUM* HEDW. ПІД ВПЛИВОМ АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ПОСТТЕХНОГЕННИХ ТЕРИТОРІЯХ ВИДОБУТКУ СІРКИ

ОКСАНА ЛЬВІВНА БАЇК

БАЇК О. Л. Біохімічна мінливість моху *Bryum caespiticium* Hedw. під впливом абіотичних факторів на посттехногенних територіях видобутку сірки // Наукові основи збереження біотичної різноманітності. – 2012. – Том 3(10), № 1. – С. 183-190. – ISSN 2220-03087.

Проаналізовані електрофоретичні спектри кислих розчинних білків і множинних молекулярних форм естерази та пероксидази моху *Bryum caespiticium* Hedw. із дослідних трансект відвалу № 1 Язівського сірчаного родовища державного гірничо-хімічного підприємства “Сірка” та фонової території природного заповідника “Розточчя” залежно від температури, інтенсивності світла й вологості субстрату. Встановлено, що за екстремальних мікрокліматичних умов в особин моху з вершини відвалу з’являються низькомолекулярні фракції білків і ферментів, що свідчить про його біохімічну адаптацію до стресової дії абіотичних факторів.

Ключові слова: абіотичні фактори, електрофоретичний спектр, кислі розчинні білки, множинні молекулярні форми естерази та пероксидази, *Bryum caespiticium*

Вивчення впливу екологічних стресорів на рослини – одна з найактуальніших проблем сучасної біології. Інтенсивне антропогенне, зокрема, техногенне, навантаження може призвести до масштабних екологічних змін і 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. Унаслідок видобутку сірки на поверхню відвалу виносяться неродючі породи, для яких характерні низька водоутримувальна здатність і негативний вплив на ріст і розвиток рослин.

Дія різних абіотичних факторів на відвалі видобутку сірки таких як посуха, температурний стрес (особливо в літні місяці), підвищена інсоляція, сильні вітри, можуть 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 молекулярні й структурні клітинні компоненти (Пятыгин, 2008). Основні адаптивні зміни в рослин відбуваються як на морфологічному, так, у першу чергу, й на біохімічному рівнях (Beck, Lüttge, 1990). Стійкість рослин до абіотичних стресорів зумовлена експресією генів, які беруть участь у сигнальних або регуляторних системах, у запуску синтезу стресових білків, функціональних і структурних метаболітів (Rampitsch, Srinivasan, 2006; Юрина, Одинцова, 2007).

У зв’язку з цим, метою нашої роботи була порівняльна оцінка електрофоретичного спектра кислих розчинних білків і множинних молекулярних

форм естерази та пероксидази моху *Bryum caespiticium* Hedw. залежно від мікрокліматичних умов на посттехногенних і фонових територіях.

Матеріали та методика досліджень

Об'єктом досліджень були рослини моху *Bryum caespiticium*, який є домінантом на території відвалу № 1 Язівського сірчаного родовища Новояворівського державного гірничо-хімічного підприємства (ДГХП) "Сірка". Зразки моху збирали на дослідних трансектах (основа та вершина відвалу 30 м заввишки) улітку та восени 2011 року. Контролем були рослини, відібрані з фонові території природного заповідника (ПЗ) "Розточчя".

Досліджували комплексну дію температури, інтенсивності світла й вологості субстрату на електрофоретичний спектр кислих розчинних білків і множинних молекулярних форм ферментів у пагонах *B. caespiticium*. Для електрофоретичного аналізу кислих розчинних білків і множинних молекулярних форм пероксидази та естерази моху свіжозібраний рослинний 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). Одержаний гомогенат центрифугували за 3 тис. об/хв. До супернатанту додавали 70% розчин сахарози з розрахунку 0,2 мл розчину сахарози на 1 мл екстракту (Scandalios, 1979). На поверхню гелю в електрофоретичних стовпчиках наносили витяжки об'ємом до 0,25 мл, які містили 50-250 мкг білка. Уміст білка визначали за методом О. А. Лоурі (Lowry et al., 1951). Для виявлення пероксидаз застосовували інкубаційне середовище з бензидином (Методы..., 1987), а естерази – з 5-броміндоксилацетатом (Rothe, 1972).

Уміст гігроскопічної вологи в субстраті визначали за методикою Е. В. Аринушкіної (Аринушкіна, 1970).

Інтенсивність освітлення на дослідних ділянках визначали за допомогою люксметра Ю116.

Результати досліджень та їх обговорення

У літературі (Тарчевский, 2002; Газарян, Хушпульян, Тишков, 2006; Граскова и др., 2010) описана ціла низка неспецифічних реакцій рослин щодо впливу абіотичних стресорів, до яких, перш за все, належить нагромадження захисних речовин, зокрема, стресових білків. Білки, у тому числі стресові, є ключовою складовою захисних систем, яка забезпечує підтримання клітинного гомеостазу у стресових умовах (Wang et al., 2004). Біосинтез стресових білків є одним з основних компонентів адаптаційного синдрому (Косаковская, 2008; Косаковская и др., 2010). Зміни в спектрах захисних білків та експресійної активності їх генів під впливом абіотичних чинників дають можливість виявити фізіолого-біохімічні передумови адаптації рослин.

Встановлено відмінності за електрофоретичними спектрами кислих розчинних білків і молекулярних форм естерази та пероксидази між зразками

моху з дослідних ділянок. Аналіз електрофореграм кислих розчинних білків свідчить, що сім білкових фракцій властиві для кожного із проаналізованих зразків моху (рис. 1).

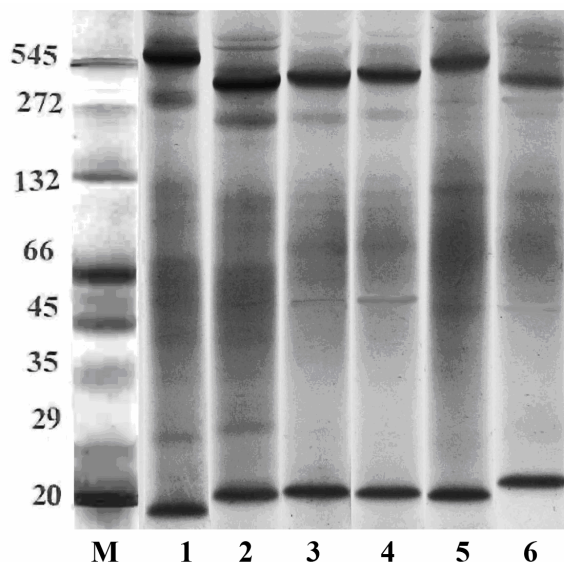


Рис. 1. Електрофоретичний спектр кислих розчинних білків *Bryum caespiticium* Hedw. з різних місцевиростань: М – маркер; 1, 2 – вершина відвалу; 3, 4 – основа відвалу; 5, 6 – ПЗ “Розточчя”.

Однак, виявлені й специфічні для окремих зразків електрофоретичні смуги білків. В електрофоретичному спектрі кислих розчинних білків моху *B. caespiticium* із вершини відвалу, де висока напруженість екологічних факторів (табл.), з’явилася нова низькомолекулярна фракція з ММ 29 кД, яка відсутня у рослин з інших дослідних трансект (рис. 1).

У зразках моху з основи відвалу, порівняно з фоновою територією ПЗ “Розточчя”, виявлено лише кількісні відмінності в білковому спектрі. Це, перш за все, стосується значно слабшої інтенсивності фракцій з ММ 66 та 132 кД.

Таким чином, виявлені відмінності в білкових спектрах моху *B. caespiticium* у контролі та з дослідних трансект відвалу видобутку сірки за дії абіотичних стресових чинників дають підставу вважати білки можливими біомаркерами реакції рослинного організму на несприятливі екологічні умови.

Поліморфізм множинних молекулярних форм ферментів, який контролюється на генетичному рівні, істотно залежить від зовнішніх впливів, у мохів, зокрема, від дефіциту вологи та високої температури (Taylor, Schofield, Elliot, 1970). Тому, вивчення ензимного апарату в умовах абіотичного стресу є важливим, оскільки дає можливість виявити особливості біохімічної мінливості рослинного організму.

Умови місцевиростань *Bryum caespiticium* Hedw. на дослідних трансектах

| Екологічні фактори | Дослідні трансекти | | |
|--------------------------------|--------------------|----------------|---------------|
| | Вершина відвалу | Основа відвалу | ПЗ “Розточчя” |
| Інтенсивність світла (тис. лк) | 100-110 | 75-85 | 65-75 |
| Вологість субстрату (%) | 4,5-14,8 | 25,3-27,5 | 39,0-45,6 |
| Температура (°C) | 35,5-38,5 | 24,0-26,5 | 22,5-25,5 |

Порівняння спектрів множинних молекулярних форм естерази досліджених зразків моху залежно від умов місцевиростань показало, що їх відмінності мають переважно кількісний характер. Однак, є й якісні зміни естеразних спектрів у рослинах з вершини відвалу, оскільки з'явилися дві нові смуги активностей з ММ 20 та 29 кД, які відсутні в інших дослідних зразках. Крім цього, в ізозимному спектрі естерази, можливо, проявляється ефект дози гена за фракцією з ММ 132 кД у рослин з вершини відвалу (рис. 2). Імовірно, це можна пояснити зміною експресивності окремих генів за екстремальних умов, які спостерігалися на вершині відвалу.

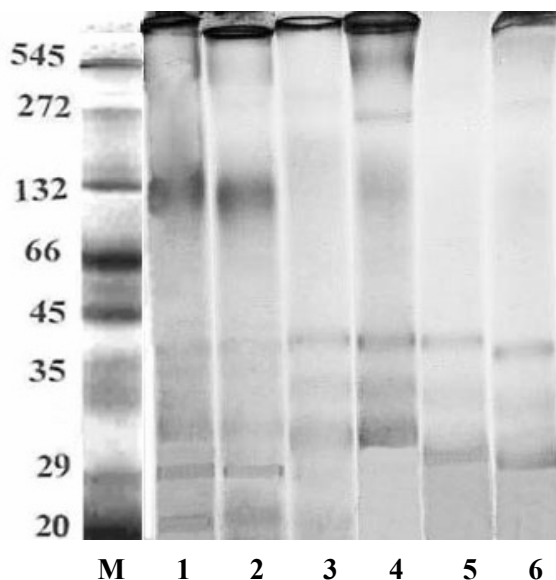


Рис. 2. Електрофоретичний спектр естерази *Bryum caespiticium* Hedw. з різних місцевиростань: М – маркер; 1, 2 – вершина відвалу; 3, 4 – основа відвалу; 5, 6 – ПЗ “Розточчя”.

Серед ферментів, які забезпечують гомеостаз рослинного організму, важливу роль відіграє пероксидаза, яка є одним із маркерних ферментів і практич-

но першою активується у відповідь на стрес. Цей фермент локалізується в різних органах рослинних клітин (Троицкая, 2000), що передбачає диференційне включення його ізоформ у захисні системи рослин.

Пероксидаза належить до поліфункціональних білків, є конституційно необхідною та бере участь у різних біохімічних реакціях живих організмів. Пероксидаза, ймовірно, може впливати на утворення низькомолекулярних стресових білків. Активність пероксидаз корелює з розвитком стійкості рослин до абіотичних стресів (Рогожин, 2004; Алиева, Бабаев, Азизов, 2010). Кількість молекулярних форм пероксидази є досить мінливою, що дає підставу використовувати її як маркер фізіологічного стану рослин (Юсупова, Хайруллин, Максимов, 2006).

Ізоферментний спектр пероксидази моху *B. caespiticium* на дослідних трансектах відвалу дуже мінливий і містить, принаймні, по 4-5 стабільних електрофоретичних фракцій. Однак, їх експресія у рослинах моху з дослідних трансект значно різниться. У зразках моху на вершині відвалу за найменш сприятливих екологічних умов виявлена низькомолекулярна фракція з ММ 35 кД, яка відсутня в рослин з основи відвалу та ПЗ “Розточья” (рис. 3).

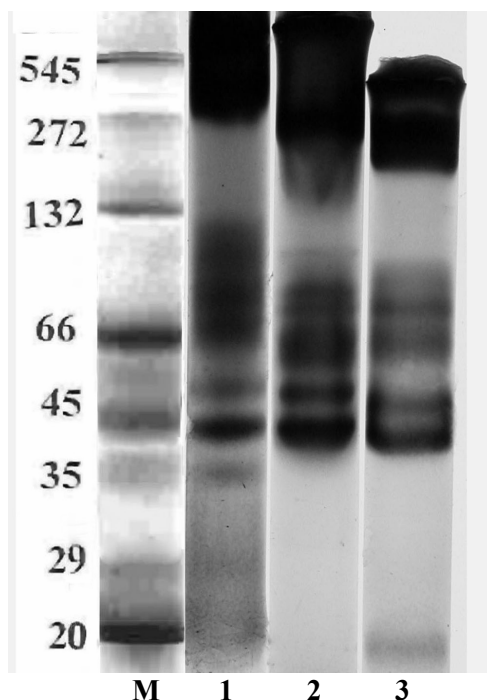


Рис. 3. Електрофоретичний спектр пероксидази моху *Bryum caespiticium* Hedw. з різних місцевиростань: М – маркер; 1 – вершина відвалу; 2 – основа відвалу; 3 – ПЗ “Розточья”.

Висновки

Результати електрофоретичного аналізу білків і ферментів свідчать, що в екстремальних умовах на вершині відвалу в особин моху з'являються низькомолекулярні фракції білків і ферментів, які за літературними даними належать до стресових (Косаковская, 2008; Косаковская и др., 2010). Аналіз електрофоретичних спектрів кислих розчинних білків, естерази та пероксидази *B. caespiticium* вказує на широкий діапазон біохімічної мінливості цього виду моху, що дає йому можливість адаптуватися до несприятливих екологічних умов.

-
- АЛИЕВА Д. Р., БАБАЕВ Г. Г., АЗИЗОВ И. В. Активность и изоферментный состав пероксидазы клеток *Dunaliella salina* при солевом стрессе // Вісник Дніпропетровського ун-ту. Біологія. Медицина. – 2010. – Т. 1. – Вип. 1. – С. 16-21.
- АРИНУШКИНА Е. В. Руководство по химическому анализу почв. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 488 с.
- ГАЗАРЯН И. Г., ХУШПУЛЬЯН Д. М., ТИШКОВ В. И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303-322.
- ГРАСКОВА И. А., ЖИВЕТЬЕВ М. А., ПУТИЛИНА Т. Е., КРАСНОБАЕВ В. А., ВОЙНИКОВ В. К. Активность и изоферментный спектр пероксидазы листьев некоторых видов травянистых растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе // Электронный науч. журн. "Исследовано в России". – 2010. – С. 293-303.
- КОСАКОВСКАЯ И. В. Стрессовые белки растений. – К.: Укр. фитосоціол. центр, 2008. – 151 с.
- КОСАКОВСКАЯ И. В., КЛИМЧУК Д. А., ДЕМИРЕВСКАЯ К., БЛЮМА Д. А., УСТИНОВА А. Ю. Влияние стрессовых температур на электрофоретический спектр белков и ультраструктуру клеток листьев растений разных типов экологических стратегий // Вісник Харківського аграрного національного ун-ту. Сер. біол. – 2010. – Вип. 1(19). – С. 34-43.
- МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ / Под ред. А. И. Ермакова. 3-е изд., переработанное и дополненное. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 325 с.
- ПЯТЫГИН С. С. Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общей биологии. – 2008. – Т. 69, № 4. – С. 294-298.
- РОГОЖИН В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – С-Пб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
- ТАРЧЕВСКИЙ И. А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
- ТРОИЦКАЯ Л. А. Характеристика пероксидазы каллусной ткани *Rauvolfia serpentina* Benth // Растит. ресурсы. – 2000. – № 4. – С. 105-109.
- 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.
- ЮСУПОВА З. Р., ХАЙРУЛЛИН Р. М., МАКСИМОВ И. В. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum*

- Berk. // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 910-917.
- BECK E., LÜTTGE U. Streß bei Pflanzen Biol // Unserer Zeit. – 1990. – В. 20. – S. 237-244.
- LOWRY O. A., ROSENBOUGH 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.
- ROTHER G. Unterschiede im Enzymmuster von Protonema, Moospflänsche, Sporogon und Kallus der Laubmooskrouzung *Funaria hygrometrica* × *Physcomitrium piriforme* // Beitr. Biol. Pflanz. – 1972. – Vol. 48, № 3. – S. 433-444.
- SCANDALIOS J. G. Control of gene expression and enzyme differentiation // Physiol. Genetics. – New York; London; Toronto; Sydney; San Francisco: Academic Press, 1979. – P. 64-105.
- TAYLOR I. E. P., SCHOFIELD W. B., ELLIOT A. M. Analysis of moss dehydrogenases by polyacrylamide disc electrophoresis // Can. J. Bot. – 1970. – Vol. 48. – P. 367-369.
- WANG W., VINOCUR B., SHOSEYOV O., ALTMAN A. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, № 5. – P. 244-252.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МХА *BRYUM CAESPITICIMUM* HEDW. ПОД ВЛИЯНИЕМ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПОСТТЕХНОГЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ДОБЫЧИ СЕРЫ

О. Л. БАИК

Проанализировано электрофоретические спектры кислых растворимых белков и множественных молекулярных форм эстеразы и пероксидазы мха *Bryum caespiticium* Hedw. на опытных трансектах отвала № 1 Язовского месторождения серы государственного горно-химического предприятия “Сера” и с фоновой территории природного заповедника “Расточье” в зависимости от температуры, интенсивности света и влажности. Установлено, что в экстремальных условиях на вершине отвала у мха появляются низкомолекулярные фракции белков и ферментов, что свидетельствует о его биохимической адаптации к стрессовому действию абіотических факторов.

Ключевые слова: абіотические факторы, электрофоретический спектр, кислые растворимые белки, множественные молекулярные формы эстеразы и пероксидазы, *Bryum caespiticium*

BIOCHEMICAL VARIABILITY OF THE MOSS *BRYUM CAESPITICIMUM* HEDW. UNDER THE INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS ON POSTTECHNOGENIC TERRITORIES OF SULPHUR EXTRACTION

O. L. BAİK

The electrophoretic spectra of acid soluble proteins and multiple molecular forms of esterase and peroxidase are analysed in the moss *Bryum caespiticium* Hedw. on the experimental transects on the territory of Yavoriv State Mining-Chemical Enterprise “Sirka” and from background territory of nature reserve “Roztochja” depending on a temperature, intensity of light and humidity of the substrate. It is established under extreme conditions low-molecular fractions of proteins and enzymes activate in moss on the top of the dump, which testifies its biochemical adaptation to the stress action of abiotic factors.

Key words: abiotic factors, electrophoretic spectrum, acid soluble proteins, multiple molecular forms of esterase and peroxidase, *Bryum caespiticium*

Надійшла 14.02.2012
Прийнята до друку 29.05.2012

БАІК О. Л. Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаника, 11, м. Львів, 79000, Україна; e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua

BAIK O. L. Institute of Ecology of the Carpathians NAS of Ukraine, 11 Stefanyk St, Lviv, 79020, Ukraine; e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua