

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ МОХІВ НА ДІЮ АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ НА ПОСТТЕХНОГЕННИХ ТЕРИТОРІЯХ ВИДОБУТКУ СІРКИ

О. Баїк, Н. Кіт

*Інститут екології Карпат НАН України
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна
e-mail: baik.oksana@gmail.com*

Досліджено морфологічну структуру дернин і активність основних ферментів антиоксидантного захисту: пероксидази, супероксиддисмутази (СОД) і каталази домінуючих видів мохів *Barbula unguiculata* Hedw., *Bryum caespiticium* Hedw., *Bryum argenteum* Hedw. і *Brachythecium salebrosum* (Hoffm. ex F. Weber & D. Mohr) Schimp. із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки у літній та осінній сезони.

Показано, що морфологічна структура дернин мохів *B. argenteum* і *B. salebrosum* на посттехногенних територіях видобутку сірки є важливою для збереження вологості і залежить від мікрокліматичних умов місцевиростання та життєвої форми виду. Виявлено, що активність ензимів залежить від видових особливостей мохів. Установлено залежність активності антиоксидантних ферментів у досліджуваних мохів від інтенсивності освітлення й температури на трансектах відвалу № 1. У літній період відзначено найвищі показники активності антиоксидантних ензимів у зразках мохів з північної вершини відвалу, де особливо відчутні вплив високих температур та інтенсивності освітлення, а також нестача вологості. В умовах експерименту у *B. unguiculata* і *B. caespiticium* з північної вершини відвалу під впливом 24-годинної дії температури 42 °С встановлено найістотніше зростання активності пероксидази в 1,2–1,4 та СОД в 1,6–1,9 рази. Збільшення активності пероксидази та СОД, спричинені гіпертермією, нівелювалися завдяки попередній обробці інгібітором біосинтезу білка циклогексамідом, що може свідчити про участь білоксинтезувальної системи у цьому процесі. Ймовірно, підвищення активності ферментів-антиоксидантів, зумовлене насамперед зміною експресії генів стресових білків, які контролюють синтез специфічних адаптогенів і протекторів, свідчить, що екстремальні умови антропогенно трансформованого середовища сприяють розвиткові форм організмів із найвищими потенційними можливостями.

Ключові слова: оксидний стрес, пероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, мохи

Дія різних абіотичних факторів, таких як посуха, засоленість, температурний стрес (особливо у літні місяці), підвищена інсоляція, сильні вітри, можуть призвести до активації захисних і пристосувальних реакцій рослин [12, 21, 24, 30, 46]. Адаптація рослин контролюється складною молекулярно-генетичною системою, яка індукує певний стрес-реагуючий механізм, що забезпечує підтримання гомеостазу рослинного організму і захищає від руйнування молекулярної та структурної організації клітин [20, 31, 32, 49]. Основні адаптивні зміни у рослин відбуваються на морфологічному та, насамперед, на біохімічному рівнях [13, 43, 51]. 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 [14, 23, 40, 47].

Температурний та інсоляційний режими, а також вологість місцезростання, є одними з потужних абіотичних факторів впливу середовища на рослинний організм [10, 11, 25,

28, 55]. Актуальності нині набувають дослідження стійкості рослин до несприятливих температур, яка є результатом фізіолого-біохімічних перетворень [9, 52, 57]. У стійкості рослин до дії стрес-факторів значну роль відіграють неспецифічні захисні системи, зокрема, антиоксидантна система [8, 17, 41]. Під дією помірного стресу виживання рослин забезпечується індукцією антиоксидантного захисту для підтримання редокс-балансу [33]. Оксидний стрес настає, коли окисно-відновний баланс порушується або через підвищену продукцію активних форм кисню (АФК), або через виснаження антиоксидантного захисту, або через поєднання обох причин. У кінцевому підсумку він може призводити до клітинного колапсу у рослин [14, 35]. Тому метою досліджень було вивчити морфологічні реакції та зміни активності ферментних антиоксидантів як показників оксидного стресу у мохів за умов різної вологості та під впливом високої температури й інтенсивності освітлення у техногенно трансформованому середовищі.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були мохи з різними життєвими формами: *Bryum caespitici-um* Hedw. (низька щільна дернинка), *Bryum argenteum* Hedw. та *Barbula unguiculata* Hedw. (низька пухка дернинка), *Brachythecium salebrosum* (Hoffm. ex F. Weber & D. Mohr) Schimp. (плетиво), зібрані на дослідних ділянках (основа, північний схил і північна вершина) відвалу видобутку сірки Новояворівського державного гірничо-хімічного підприємства «Сірка» (Львівська обл.). Дослідження проводили влітку за температури +35,0 °С – +38,0 °С й інтенсивності освітлення 110 тис. лк і восени за температури +14 °С – +16 °С, інсоляції \approx 80 тис. лк. Інтенсивність освітлення на дослідних ділянках вимірювали люксметром Ю-116.

Вміст вологи у мохових дернинах визначали ваговим методом і обчислювали у відсотках від маси абсолютно сухої речовини [18, 19].

Вміст гігроскопічної вологи у субстраті визначали за методикою О. В. Аринушкіної [1].

Морфометричні вимірювання довжини пагонів, розмірів клітин і листків виконували на моторизованому мікроскопі Axio Imager M1 (Carl Zeiss) з використанням програмного забезпечення Carl Zeiss AxioVision 4.6 та UTHSCSA Image Tool 3.0, стереобінокюляри Stemi 2000-C (Carl Zeiss) з фотонасадкою та цифровою камерою „Nikon”.

Для визначення активності пероксидази наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,1 М ацетатному буфері (рН 5,4) у співвідношенні 1:1, екстрагували 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 [16].

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) рослинний матеріал екстрагували протягом 30 хв у 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8). Супернатант, отриманий після центрифугування (10 хв, 5000 г), додавали до інкубаційного середовища, що містило: 0,33 мМ ЕДТА, 0,4 мМ нітросиній тетразолій, 0,01 мМ феназинметасульфат і 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 [22].

Активність каталази визначали після екстракції у 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,8). Екстракт центрифугували протягом 15 хв за 5000 г. Активність ферменту визначали у надосадовій рідині спектрофотометрично на основі реакції з 4 % розчином молібдату амонію. Активність ферменту виражали в мкМ H_2O_2 на мг білка за хв [15].

Результати статистично проаналізували, визначивши середнє значення, медіану, стандартне відхилення (SD), а також перший і третій квартилі для кожної характеристики у всіх варіантах експерименту. Відбір порівнювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з корекцією Бонферроні, враховуючи відмінності між відборами, достовірними на рівні $P < 0,05$, $0,01$ і $0,001$. Усі розрахунки та розробки діаграм виконано в програмі Statistica 8.0 (StatSoft, США, 2012).

Результати і їхнє обговорення

Бріофіти є піонерними рослинами на посттехногенних територіях, які завдяки особливостям морфологічної будови здатні пристосовуватися до несприятливих умов зовнішнього середовища з характерними лише для них життєвими формами. Мохоподібні, особливостями водного режиму яких є пойкилогідричність і високий вміст поверхневої води, відзначаються високою цитоплазматичною стійкістю як до тривалого водного стресу, так і до висушування [6, 45]. Завдяки простоті будови мохи виробили ефективну систему регуляції вмісту води: унікальну поглинальну й водоутримувальну здатність і можливість швидкої регідратації. Відсутність продихів і лігнінкової кутикули у бріофітів забезпечує вільний обмін крізь клітинні стінки водою, речовинами і газами [53]. Передумовою розвитку мохів є забезпечення водою. Оскільки її джерела – опади, туман і роса – нерегулярні, мохи мають різноманітні механізми толерантності до висушування.

Водний режим мохів тісно пов'язаний з їхніми розмірами і життєвою формою, адже збереження вологи у моховому покриві залежить від кількості води в капілярах між пагонами у дернинці, яка характеризується певною структурою та щільністю. Щільність дернинок мохів є вагомим індикатором їхнього життєвого стану і визначається насамперед видовою специфічністю мохів, едафічним фоном, екологічними умовами виростання – рівнем освітленості, температури і вологості [4, 6]. Для мохів *B. argenteum* і *B. salebrosum* встановлено збільшення кількості пагонів на одиницю площі на вершині, порівняно з основою. *B. argenteum* на північній вершині в умовах дефіциту вологи (вологість оголеного субстрату $6,3 \pm 0,7$ %) утворював дернини з великою густиною пагонів ($79,6 \pm 7,3$ пагонів/см²), порівняно з основою ($53,2 \pm 6,1$ пагонів/см²). Для *B. salebrosum* густина пагонів була менш мінливою (на вершині становила $18,6 \pm 2,1$ пагонів/см², а в основі – $15,5 \pm 1,7$ пагонів/см²). Це пов'язане, очевидно, з тим, що особини *B. argenteum* порівняно дрібніші, а це сприяє їхньому швидкому зневодненню, яке може бути зменшене за формування дуже щільних дернин. Показник густоти дернинок у *B. argenteum* свідчить про значні екологічні можливості цього виду в освоєнні різних за рівнем зволоження місцезростань.

На північній вершині відвалу спостерігалось суттєве сповільнення росту пагонів у обох досліджуваних видів. Встановлено зменшення довжини пагонів *B. argenteum* на вершині відвалу порівняно з основою з $0,84 \pm 0,07$ см до $0,65 \pm 0,06$ см, *B. salebrosum* – з $2,36 \pm 0,19$ см до $1,82 \pm 0,17$ см, що спричинено несприятливими мікрокліматичними умовами на північній вершині відвалу. В обох видів мохів в умовах водного дефіциту зменшувалися розміри листової пластинки: для *B. argenteum* відзначено тенденцію до звуження листків: довжина і ширина листової пластинки на північній вершині становила $0,64 \pm 0,05$ мм і $0,38 \pm 0,04$ мм, а в основі – $0,78 \pm 0,06$ мм і $0,55 \pm 0,04$ мм відповідно. Для *B. salebrosum* розміри листової пластинки на північній вершині відвалу були меншими в 1,2 разу, порівняно з основою. Змінювалися і розміри клітин листка: довжина та ширина клітин листової пластинки для *B. argenteum* на північній вершині становила $46,7 \pm 4,2$ мкм і $11,8 \pm 1,2$ мкм, порівняно з основою ($59,3 \pm 5,6$ мкм і $15,2 \pm 1,6$ мкм). Для *B. salebrosum* ці відмінності були менш вираженими, очевидно, через трохи сприятливіші умови локалітетів рослин цього виду. Для *B. salebrosum* довжина і ширина клітин листової пластинки становили: $62,5 \pm 6,5$ мкм і $8,2 \pm 0,9$ мкм на північній вершині та $74,2 \pm 7,8$ мкм і $9,4 \pm 1,0$ мкм – в основі (див. таблицю).

Залежність морфометричних параметрів мохів *B. argenteum* і *B. salebrosum*
від умов місцевиростань (вершина й основа північної експозиції)
на території відвалу видобутку сірки

Місце зростання	Висота пагонів, см	Розміри листків, мм		Розміри клітин листка, мкм		Густота пагонів, паг/см ²
		Довжина	Ширина	Довжина	Ширина	
<i>B. argenteum</i>						
Вершина	0,65±0,06*	0,64±0,05**	0,38±0,04	46,7±4,2	11,8±1,2*	79,6±7,3**
Основа	0,84±0,07	0,78±0,06	0,55±0,04	59,3±5,6	15,2±1,6*	51,2±6,1**
<i>B. salebrosum</i>						
Вершина	1,82±0,17*	1,73±0,18**	0,83±0,07	62,5±6,5	8,2±0,9*	18,6±2,1**
Основа	2,36±0,19	2,08±0,21**	0,83±0,07	74,2±7,8	9,4±1,0*	15,5±1,7**

Отже, в несприятливих мікрокліматичних умовах на вершині відвалу видобутку сірки дернини *B. argenteum* і *B. salebrosum* виявляли ознаки ксероморфності: мохи формували щільніші дернини з меншими листками на пагонах, що забезпечувало зниження випаровування вологи в умовах водного дефіциту. Ці дані узгоджуються з дослідженнями І. А. Гончарової [4] на дернинках сфагнових мохів, стійкість і стабільне функціонування яких визначається густотою пагонів, їхньою довжиною та розмірами листків.

Процес адаптації рослин до стресових умов існування включає, окрім морфологічних змін, активну участь компонентів ферментативної системи захисту, які відіграють важливу роль у захисних реакціях рослин. Важлива роль в адаптивних реакціях рослин належить пероксидазі, супероксиддисмутазі (СОД) та каталазі, що входять до складу антиоксидантної системи (АОС), активність якої визначає рівень стійкості рослин до несприятливих факторів зовнішнього середовища [34, 53].

Одними із центральних ферментів у дослідженні механізмів адаптації є ізоформи пероксидази, яка належать до надзвичайно лабільних і поліфункціональних «стресових» ферментів антиоксидантного захисту. Цей фермент здатний знешкоджувати токсичні перекисні сполуки, які утворюються у клітині під впливом стресових факторів [48].

Установлено залежність активності пероксидази *B. unguiculata*, *B. caespiticium*, *B. argenteum* і *B. salebrosum* із різних місцевиростань північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки від вологості, інтенсивності освітлення й температури. Особливо вирізняється активність пероксидази досліджуваних видів мохів у літній період за високої температури 35,0–37,5 °С та інтенсивності освітлення 110 тис. лк на північній вершині й північному схилі відвалу, порівняно з основою.

Так, активність пероксидази у *B. unguiculata* була найвищою у зразків із північної вершини відвалу та становила 23,8±0,3 (відн. од./г с. м.), тобто була приблизно в 1,19 разу вищою, ніж в основі відвалу (20,0±0,4 відн. од./г с. м.) (рис. 1). Показники активності пероксидази у *B. caespiticium* були також найвищими на північній експозиції (вершина та схил) відвалу і становили 20,9±0,2 і 24,7±0,2 (відн. од./г с. м.) відповідно, тобто були в 1,21–1,43 разу вищими, ніж в основі відвалу (рис. 2). Експериментальними дослідженнями за 24-годинної дії температури +42 °С на пагони мохів встановлено підвищення активності пероксидази у зразках *B. unguiculata* з усіх трансект в 1,52–1,71 разу (рис. 1), а у *B. caespiticium* приблизно в 1,82 разу (рис. 2). Так, найбільшу активність пероксидази спостерігали у зразках *B. unguiculata* з північної вершини відвалу (39,8±0,2 відн. од./г с. м.). Натомість найбільшу активність пероксидази за дії гіпертермії спостерігали у зразках *B. caespiticium* не лише з північної вершини, а й із північного схилу: 37,3±0,2 та 44,7±0,2 відн. од./г с. м., відповідно (рис. 1, 2).

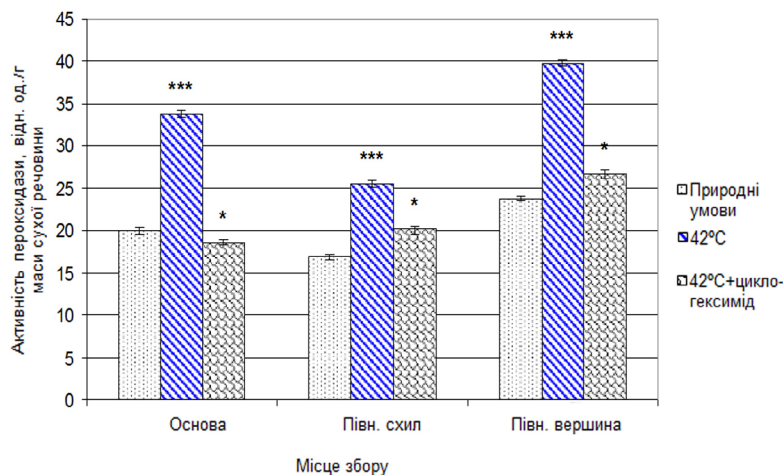


Рис. 1. Активність пероксидази (відн. од./г сухої маси) в пагонах моху *B. unguiculata* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина) ($M \pm m$; $n=4$); * – статистично достовірна різниця між експериментальними зразками і контролем за $P<0,05$; *** – за $P<0,001$

Fig. 1. Peroxidase activity (relative units/g of dry weight) in shoots of the moss *B. unguiculata* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 (base, slope and top) ($\bar{x} \pm SD$; $n=4$); * – difference between experimental sample and control is statistically reliable at $P<0.05$; *** – at $P<0.001$

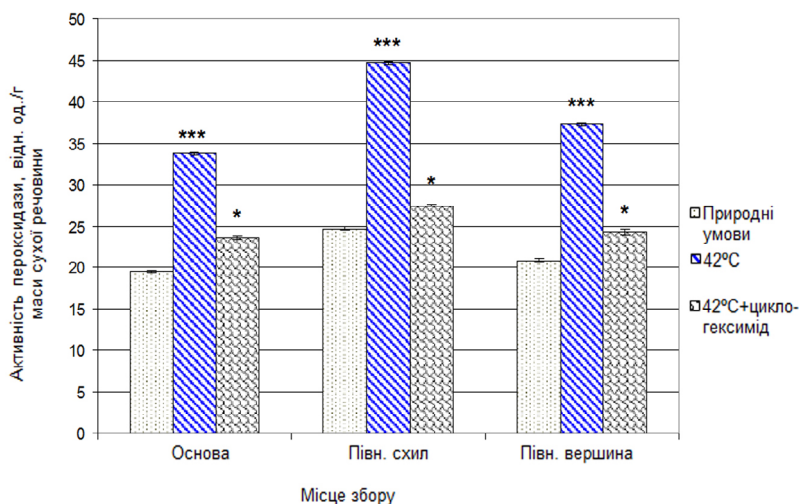


Рис. 2. Активність пероксидази (відн. од./г сухої маси) в пагонах моху *B. caespiticium* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки (основа, схил і вершина) ($M \pm m$; $n=4$); * – статистично достовірна різниця між експериментальними зразками і контролем за $P<0,05$; *** – за $P<0,001$

Fig. 2. Peroxidase activity (relative units/g of dry weight) in shoots of the moss *B. caespiticium* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 (base, slope and top) ($\bar{x} \pm SD$; $n=4$); * – difference between experimental sample and control is statistically reliable at $P<0.05$; *** – at $P<0.001$

Збільшення активності пероксидази, спричинене 24-годинною дією температури +42 °С, усували завдяки попередній обробці інгібітором біосинтезу білка циклогексамідом (ЦГ). Такі результати можуть свідчити про участь білоксинтезувальної системи у підвищенні активності ферменту, зумовлене гіпертермією.

Улітку для *B. argenteum* на північній вершині відвалу в умовах дефіциту вологи активність пероксидази становила 18,8±1,9 відн. од./г с. м., а в основі лише 12,9±1,2 відн. од./г с. м., тобто була майже в 1,61 разу вищою. Для *B. salebrosum* цей показник на північній вершині становив 14,6±1,3 відн. од./г с. м., а в основі – 10,9±0,9 відн. од./г с. м., тобто переважав у 1,34 разу (рис. 3).

Підвищення активності пероксидази в пагонах досліджуваних мохів можна розглядати як адаптивну реакцію, що дає рослинам змогу влітку витримувати дію стресових чинників зовнішнього середовища, зокрема, дефіциту вологи, високої інсоляції та гіпертермії. Виявлені особливості активації пероксидази мохів за дії несприятливих мікрокліматичних умов свідчать про різні рівні антиоксидантного захисту і про здатність рослинних організмів ефективно знешкодувати АФК.

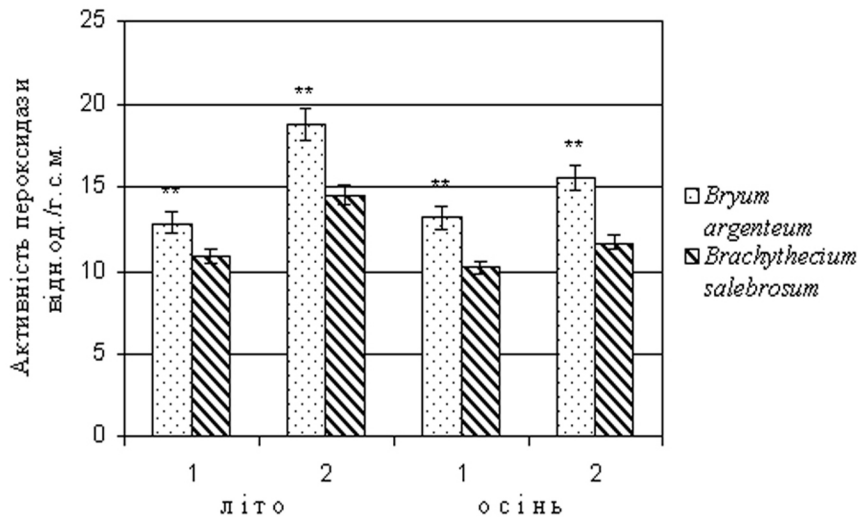


Рис. 3. Активність пероксидази (відн. од./г сухої маси) в пагонах моху *B. argenteum* і *B. salebrosum* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: 1 – основа та 2 – вершина ($M \pm m$; $n=4$); ** – статистично достовірна різниця між зразками за $P < 0,01$

Fig. 3. Peroxidase activity (relative units/g of dry weight) in shoots of the moss *B. argenteum* and *B. salebrosum* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 – base and top) ($x \pm SD$; $n=4$); ** – difference between sample is statistically reliable at $P < 0.01$

Таким чином, встановлено, що активність пероксидази залежить від видових особливостей досліджуваних мохів, зокрема, від життєвої форми. Так, у мохів із життєвою формою щільна або пухка дернинка (*B. caespitium*, *B. unguiculata*, *B. argenteum*) показники активності пероксидази за дії екстремальних факторів були значно вищими, ніж у *B. salebrosum* із життєвою формою плетиво. Восени, коли температурний та інсоляційний рівні знижувались, активність пероксидази мохів з усіх місцевиростань трохи знижувалася, хоча найвищі значення активності ферменту у зразках із вершини відвалу зберігалися.

Ключовим ферментом, задіяним у процесі детоксикації АФК, є СОД. Уперше ензим досліджений McCord і Fridovich у 1969 р. [44], він каталізує перетворення супероксиду на

пероксид водню і молекулярний кисень. СОД розглядається не лише як антиоксидантний фермент, а й як компонент сигнальних систем. Сигнали, що формуються за участю АФК, зумовлюють посилення експресії генів і активацію стрес-протекторних систем. Є літературні дані [8, 29, 39] щодо функцій СОД не лише в антиоксидантному захисті клітин, а й у трансдукції сигналу дії високих температур у геном через перетворення супероксиданіон-радикала на сигнальну молекулу H_2O_2 . СОД є внутрішньоклітинним ферментом, який бере участь у реакціях дисмутації супероксидного аніон-радикала [5, 14, 36, 37]. Сигналінг за участю АФК необхідний для подальшого формування адаптивних реакцій, які зумовлюють підвищення теплостійкості рослин [13, 27, 38, 58]. Відомо, що у формуванні термостабільності рослин можлива участь індукованого білкового синтезу. Вважається, що гіпертермія спричиняє посилення синтезу більш термостабільних форм ферменту. Питання щодо впливу високих температур на активність і термостабільність СОД мохів залишається досі не дослідженим.

Проаналізовано активність СОД у пагонах досліджуваних видів мохів із різних місцевиростань відвалу № 1 видобутку сірки у літній і осінній періоди. З'ясовано, що активність СОД мохів істотно залежить від інтенсивності освітлення й температури. Особливо вирізняється активність СОД у літній період за високої температури й інтенсивності освітлення. Так, активність СОД у цей період на північному схилі й основі відвалу в *B. unguiculata* становила $9,4 \pm 0,3$ та $9,7 \pm 0,2$ (відн. од./хв мг білка) відповідно та була приблизно в 1,22 разу вищою, ніж на північній вершині відвалу (рис. 4). Натомість у *B. caespiticium* найвищі показники активності СОД відзначено у цей період на північній вершині й основі відвалу $9,1 \pm 0,3$ та $9,8 \pm 0,3$ (відн. од./хв мг білка) відповідно (рис. 5). В умовах експерименту за 24-годинної дії гіпертермії встановлено підвищення активності СОД у зразках *B. unguiculata* і *B. caespiticium* в 1,61–1,89 разу. Найістотніше зростання активності СОД виявлено у мохів з північної вершини відвалу: $16,7 \pm 0,3$ та $17,1 \pm 0,5$ (відн. од./хв мг білка) відповідно (рис. 4, 5).

Ефект зростання активності СОД, спричинений впливом гіпертермії, нівелювався обробкою гаметофорів досліджуваних зразків мохів інгібітором біосинтезу білка циклогексимідом. Отримані результати свідчать про можливість індукованого гіпертермією біосинтезу термостабільних форм СОД. Експериментальними дослідженнями встановлено, що прогрівання зразків моху приводило до підвищення активності ферментів, які генерують супероксиданіон, зокрема, пероксидази з подальшим перетворенням його на H_2O_2 за рахунок збільшення активності СОД.

Встановлено також залежність активності СОД не лише від температури й інтенсивності освітлення, а й від ступеня зволоження дернин мохів. Крім того, активність СОД може змінюватися по-різному, залежно від тривалості й інтенсивності дії стресового чинника та стійкості рослинного організму, а також від стадії розвитку тощо [2].

Зростання активності ферменту відзначено в умовах водного дефіциту, під час сольового й теплового стресів [7, 34]. Так, влітку, за умов недостатнього зволоження дернин (вологість дернин *B. argenteum* становила 16 %, а *B. salebrosum* 29 %) активність СОД була найвищою на північній вершині та становила для *B. argenteum* $9,6 \pm 0,8$ відн. од./хв мг білка, а для *B. salebrosum* $6,4 \pm 0,5$ відн. од./хв мг білка (рис. 6).

Восени за низьких температур вологість дернин мохів зростала та для *B. argenteum* становила $34,4 \pm 3,9$ %, а для *B. salebrosum* – $38 \pm 4,1$ %, що супроводжувалося зменшенням активності ферменту. Так, зокрема, активність СОД для *B. argenteum* знижувалася в 1,48 разу, а для *B. salebrosum* – в 1,30 разу.

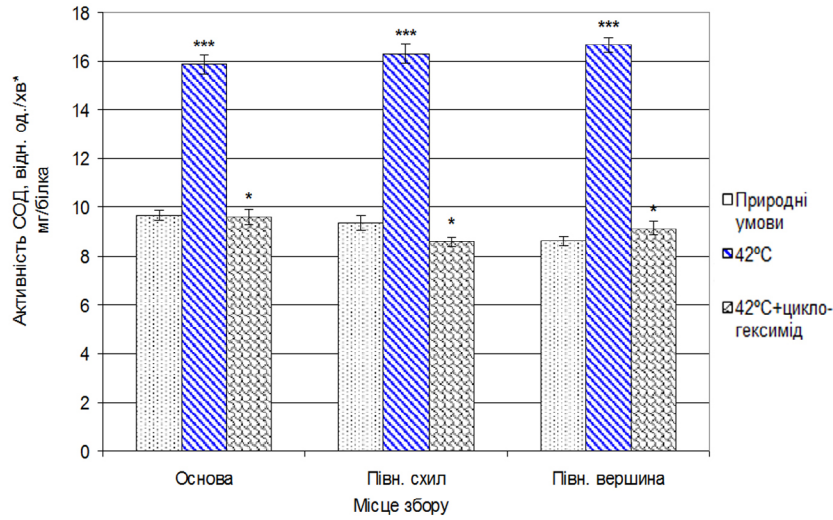


Рис. 4. Активність СОД (відн. од./хв мг білка) *B. unguiculata* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: (плато, схил і вершина) ($M \pm m$; $n=4$); * – статистично достовірна різниця між експериментальними зразками і контролем за $P < 0,05$; *** – за $P < 0,001$

Fig. 4. Superoxide dismutase activity (SOD) (relative units/min·mg/protein) in shoots of the moss *B. unguiculata* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 (base, slope, top) ($x \pm SD$; $n=4$); * – difference between experimental sample and control is statistically reliable $P < 0.05$; *** – at $P < 0.001$

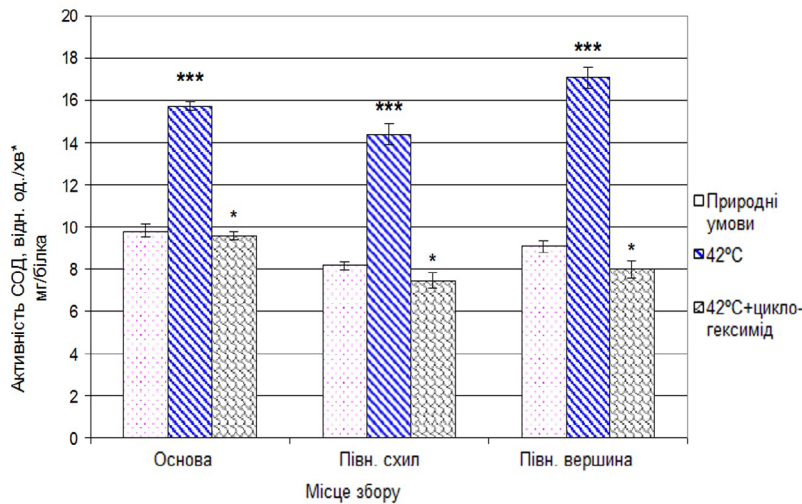


Рис. 5. Активність СОД (відн. од./хв мг білка) *B. caespiticium* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: (плато, схил і вершина) ($M \pm m$; $n=4$); * – статистично достовірна різниця між експериментальними зразками і контролем за $P < 0,05$; *** – за $P < 0,001$

Fig. 5. Superoxide dismutase activity (SOD) (relative units/min·mg/protein) in shoots of the moss *B. caespiticium* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 (base, slope, top) ($x \pm SD$; $n=4$); *** – difference between experimental sample and control is statistically reliable at $P < 0.001$

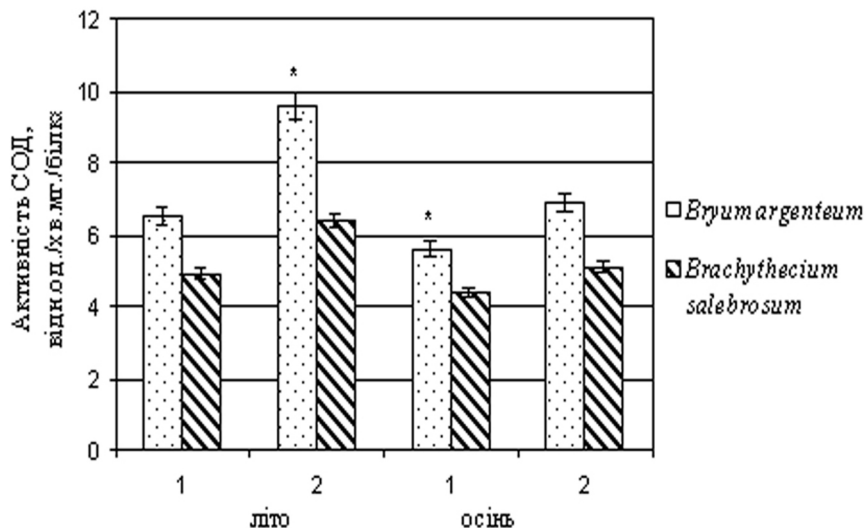


Рис. 6. Активність СОД (відн. од./хв мг білка) в пагонах моху *B. argenteum* і *B. salebrosum* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: 1 – основа та 2 – вершина ($M \pm m$; $n=4$); * – статистично достовірна різниця між зразками за $P < 0,05$

Fig. 6. Superoxide dismutase activity (SOD) (relative units/min·mg/protein) in shoots of the moss *B. argenteum* and *B. salebrosum* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 – base and 2 – top ($x \pm SD$; $n=4$); * – difference between sample is statistically reliable at $P < 0.05$

Каталаза – один із найактивніших ензимів антиоксидантної системи, що забезпечує розщеплення пероксиду водню, який утворюється в пероксисомах під час фотодихання [42, 56]. Специфікою каталази є її локалізація в пероксисомах і участь у процесах катаболізму, які активуються в процесі деструкції клітини. Захисна роль каталази добре відома за надмірного освітлення та водного дефіциту. Цей фермент бере участь у підтриманні окисно-відновного балансу в клітинах за дії оксидного стресу та сприяє адаптації організму до стрес-факторів.

У літній період за несприятливих мікрокліматичних умов відзначено найвищі показники активності каталази на північній вершині відвалу: для *B. argenteum* – $14,4 \pm 1,3$ мкМ H_2O_2 /мг білка хв, а для *B. salebrosum* – $8,5 \pm 0,7$ мкМ H_2O_2 /мг білка хв.

Восени у *B. argenteum* каталазна активність знижувалась в 1,46 разу, а у *B. salebrosum* – в 1,31 разу (рис. 7).

Ці результати узгоджуються з даними багатьох дослідників, у працях яких вказано, що активність антиоксидантних ферментів, у тому числі каталази, зростає за дії стресорів: посухи, гербіцидів, температури, засолення тощо [3, 26, 54, 59].

Визначено, що морфологічна структура дернин мохів *B. argenteum* і *B. salebrosum* на посттехногенних територіях видобутку сірки є важливою для збереження вологи і залежить від мікрокліматичних умов місцевиростання та життєвої форми виду. Дернини мохів *B. argenteum* і *B. salebrosum* за несприятливих водного й температурного режимів набували ознак ксероморфності (зменшення висоти пагонів, розмірів листової пластинки, збільшення щільності дернин), що є проявом адаптації до дефіциту вологи.

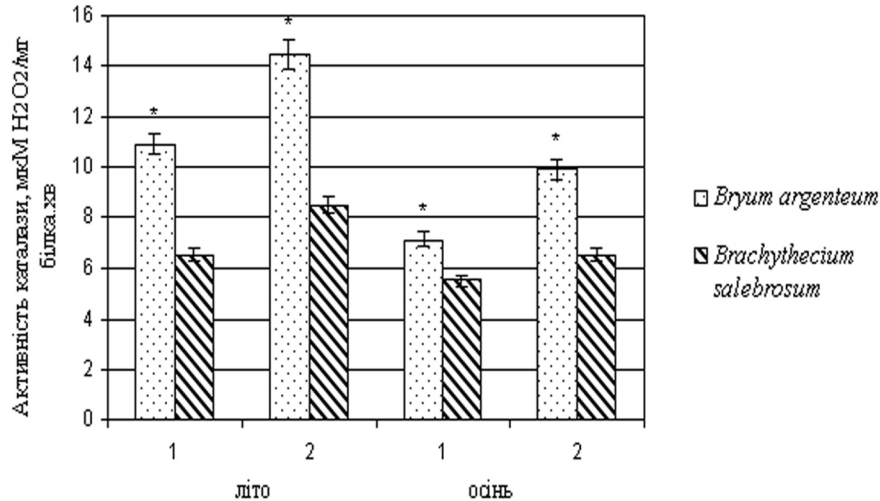


Рис. 7. Активність каталази ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{мгбілка хв}$) в пагонах моху *B. argenteum* і *B. salebrosum* із різних трансект північної експозиції відвалу № 1 видобутку сірки: 1 – основа та 2 – вершина ($M \pm m$; $n=4$); * – статистично достовірна різниця між зразками за $P < 0,05$

Fig. 7. Catalase activity ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein min}$) in shoots of the moss *B. argenteum* and *B. salebrosum* from different locations of the northern exposure of the sulfur mining dump No 1 – base and 2 – top ($x \pm \text{SD}$; $n=4$); * – difference between sample is statistically reliable at $P < 0.05$

Установлено залежність активності антиоксидантних ферментів досліджуваних мохів від інтенсивності освітлення, температури та вологості на трансектах відвалу № 1. У літній період за екстремальних умов відзначено найвищі показники активності пероксидази, СОД і каталази. Показано, що активність ензимів залежить від видових особливостей мохів. Підвищення активності ферментів-антиоксидантів зумовлене насамперед зміною експресії генів стресових білків, що контролюють синтез специфічних адаптогенів і протекторів. Отримані результати свідчать, що екстремальні умови антропогенно трансформованого середовища сприяють розвиткові форм із найвищими потенційними можливостями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аринушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв. М.: МГУ, 1970. 488 с.
2. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
3. Буздуга І. М., Волков Р. А., Панчук І. І. Втрата активності каталази 2 впливає на обмін аскорбату в арабідопсису за дії важких металів // Фізіологія рослин і генетика. 2020. Т. 52. № 4. С. 306–319. doi: <https://doi.org/10.15407/frg2020.04.306>
4. Гончарова І. А. К вопросу о структуре дерновины и продуктивности сфагновых мхов на олиготрофных болотах // Сибирский экол. журн. 2005. № 1. С. 131–134.
5. Зинь А. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз і мембранний транспорт у живих організмах // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 60. С. 21–39.
6. Іващенко О. О., Іващенко О. О. Проблеми стресів у рослин і способи їх розв'язання // Вісн. аграрн. науки. 2019. № 7. С. 27–35. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201907-04>
7. Ісаєнков С. В. Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу у рослин // Цитология и генетика. 2012. № 5. С. 50–71.

8. Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Григоренко Д. О., Фирсова К. М. Реакция растений ячменя различных генотипов на почвенную засуху и действие донора оксида азота // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер. біол. 2016. Т. 2. № 38. С. 94–105.
9. Кияк Н. Я., Байк О. Л., Кім Н. А. Морфо-фізіологічна адаптація бріофітів до екологічних факторів на девастрованих територіях видобутку сірки // Science Rise: Biological Science. 2017. Вип. 5. № 8. С. 33–38. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2017.113540>
10. Кияк Н., Буньо Л. Механізми пристосування бріофітів до сольового стресу на території хвостосховища Стебницького гірничо-хімічного підприємства “Полімінерал” // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2017. Вип. 76. С. 87–96. <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2017.76.11>
11. Кім Н. А. Особливості стійкості мохів до водного дефіциту на девастрованих територіях видобутку сірки // Наукові основи збереження біотичної різноманітності. 2012. Т. 3(10). № 1. С. 191–198.
12. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // Физиология и биохимия культ. раст. 2009. Т. 41. № 2. С. 95–108.
13. Колупаев Ю. Е., Обозный А. И. Участие активных форм кислорода в индуцировании аскорбатпероксидазы и гваяколпероксидазы при тепловом закаливании проростков пшеницы // Укр. біохім. журн. 2012. Т. 84. № 6. С. 131–138. http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2012_84_6_17
14. Колупаев Ю. Е., Обозный О. І. Активні форми кисню і антиоксидантна система при перехресній адаптації рослин до дії абіотичних стресорів // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер. біол. 2013. Т. 3. № 30. С. 18–31.
15. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1986. № 1. С. 16–20.
16. Методы биохимического исследования растений // Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. / под ред. А. И. Ермакова. Л.: Агропромиздат. Ленингр. отделение, 1987. 430 с.
17. Обозный 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. біол. 2012. Т. 2. № 26. С. 71–84.
18. Польшина С. М. Методичні рекомендації до лабораторних і практичних робіт з ґрунтознавства. Чернівці: ЧДУ, 1991. 60 с.
19. Практикум по агрохимии: уч. пособ. 2-е изд., перераб. и доп. / под ред. В. Г. Минеева. М.: Изд-во МГУ, 2001. 689 с.
20. Пятыгин С. С. Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общ. биологии. 2008. Т. 69. № 4. С. 294–298.
21. Хоркавиц Я. Д., Рінецький Р. Т., Байк О. Л. Фенотипічна і епігенетична адаптація клонів мохів до ртуті // Цитология и генетика. 2009. Т. 43. № 5. С. 311–315. doi:10.3103/S009545270905003X
22. Чевари С., Андьал Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. 1991. Т. 18. № 2. С. 9–13.
23. Юрина Н. П., Одицова М. С. Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роли в экспрессии ядерных генов // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 4. С. 485–498.
24. Alvarez S., Sanchez-Blanco M. J. Long-term effect of salinity on plant quality, water relations, photosynthetic parameters and ion distribution in *Callistemon citrinus* // Plant Biology. 2014. Vol. 16. P. 757–764. doi: 10.1111/plb.12106

25. Baik O., Kyryak N., Humeniuk O., Humeniuk V. Oxidative stress in moss *Bryum caespiticium* (Bryaceae) under the influence of high temperature and light intensity in a technogenically transformed environment // Regul. Mech. Biosyst. 2021. Vol. 12. N 4. P. 710–717. <https://doi.org/10.15421/022198>
26. Buzduga I. M., Völkov R. A., Panchuk I. I. Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants // Cytol. Genet. 2018. Vol. 52. N 1. P. 31–39. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010036>
27. Cavalcanti F. R., Oliveira J. T. A., Martins-Miranda A. S. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves // New Phytologist. 2004. Vol. 163. P. 563–571. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01139x
28. Choudhury F. K., Rivero R. M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // Plant J. 2017. Vol. 90. N 5. P. 856–867. doi: 10.1111/tbj.13299
29. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // Environ. Exp. Bot. 2015. Vol. 109. P. 212–228. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
30. Dey A., De J. N. Antioxidative potential of Bryophytes: stress tolerance and commercial perspectives: a review // Pharmacologia. 2012. Vol. 3. N 6. P. 151–159. doi: 10.5567/pharmacologia.2012.151.159
31. Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. Vol. 48. P. 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
32. Guan L. M., Scandalios J. G. Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. N 8. P. 1182–1190. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00212-4
33. Hasanuzzaman M., Borhannuddin B., Zulfiqar F. et al. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator // Antioxidants. 2020. Vol. 9. P. 681–690. doi: 10.3390/antiox9080681
34. Jiroutova P., Kovalikova Z., Toman J. et al. Complex Analysis of antioxidant Activity, Abscisic Acid Level, and Accumulation of Osmotica in Apple and Cherry In Vitro Cultures under Osmotic Stress // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. N 15. P. 7922–7937. doi: 10.3390/ijms22157922
35. Karuppanapandian Th., Moon J. Ch., Kim Ch. et al. Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms // Austr. J. Crop Sci. 2011. Vol. 5. N 6. P. 709–725.
36. Khan M. I. R., Khan N. A. Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress // Singapore: Springer. 2017. 329 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5>
37. Khan T. A., Fariduddin Q., Yusuf M. Low-temperature stress: is phytohormones application a remedy? // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. Vol. 24. N 27. P. 21574–21590. doi: 10.1007/s11356-017-9948-7
38. Khorobrykh A. Hydrogen Peroxide and Superoxide Anion Radical Photoproduction in PSII Preparations at Various Modifications of the Water-Oxidizing Complex // Plants. 2019. Vol. 8. N 9. P. 329–340. <https://doi.org/10.3390/plants8090329>
39. Kimura M., Umemoto Y., Kawano T. Hydrogen peroxide-independent generation of superoxide by plant peroxidase: hypotheses and supportive data employing ferrous ion as a model stimulus // Frontiers in Plant Sci. 2014. Vol. 5. P. 285–296. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00285>

40. Kimura S., Waszczak C., Hunter K., Wrzaczek M. Bound by fate: the role of reactive oxygen species in receptor-like kinase signaling // *Plant Cell*. 2017. Vol. 29. P. 638–654. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00947>
41. Kyjak N. Ya., Baik O. L. Role of the bryophyte cover in accumulation of organic carbon and biogenic elements in technogenic substrate on the territory of sulfur deposit // *Studia Biologica*. 2016. Vol. 10. N 3. P. 48–55. <https://doi.org/10.30970/sbi.1003.495>
42. Leung D. Studies of Catalase in Plants Under Abiotic Stress / In: *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plant*. 2018. P. 7–39. doi:10.1007/978-3-319-75088-0_2
43. Lobachevska O., Kyjak N., Khorkavtsiv O. et al. Influence of metabolic stress on the inheritance of cell determination in the moss, *Pottia intermedia* // *Cell Biol. Int.* 2005. Vol. 29. N 3. P.181–186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.02.001>
44. McCord J. M., Fridovich I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytoblast) // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. P. 6049–6055. <http://www.jbc.org/content/244/22/6049.abstract>
45. Proctor M. C. F., Tuba Z. Poikilohidry and homoiohidry: antithesis or spectrum of possibilities // *New Phytologist*. 2002. Vol. 156. P. 327–349.
46. Puthur J. T. Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. South Indian // *J. Biol. Sci.* 2016. Vol. 2. N 1. P. 9–13. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i1/100335>
47. Rampitsch C., Srinivasan M. The application of proteomics to plant biology: A review. *Canad. J. Bot.* 2011. Vol. 84. N 6. P. 883–892. doi:10.1139/b06-061
48. Scandalios J. G. Oxidative Stress: Molecular Perception and Transduction of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses // *Braz. J. Med. And Biol. Res.* 2005. Vol. 38. N 7. P. 995–1014.
49. Seel W. E., Hedry G. A. F., Lee J. A. Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and antioxidants in mosses // *J. Exp. Bot.* 1992. Vol. 43. P. 1031–1037. <https://doi.org/10.1093/jxb/43.8.1031>
50. Sharma I., Ahmad P. Catalase: a versatile antioxidant in plants / In: Ahmad, P. (Ed.) *Oxidative Damage to Plants*. 2014. P. 131–148. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
51. Smirnov N. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions / In: Smirnov, N. (ed). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 2005. P. 53–86.
52. Song J., Wu W., Hu B. Light and temperature receptors and their convergence in plants // *Biologia Plantarum*. 2020. Vol. 64. P. 159–166. doi: 10.32615/bp.2019.104
53. Turetsky M. R. New Frontiers in Bryology and Lichenology. The Role of Bryophytes in Carbon and Nitrogen Cycling // *Bryologists*. 2003. Vol. 106. N 3. P. 395–409.
54. Tyagi S., Shumayla, Madhu, Singh K. Molecular characterization revealed the role of catalases under abiotic and arsenic stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J. Hazard. Mater.* 2020. Vol. 403. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123585
55. Wadavkar D. S., Murumkar C. V., Deokule S. S., Chavan S. J. Secondary metabolite and enzyme activity on some moss species from Western Ghats, Maharashtra, India // *Bioscience Discovery*. 2017. Vol. 8. N 4. P. 716–719. <http://jbsd.in> ISSN: 2229-3469 (Print); ISSN: 2231-024X (Online).
56. Wang W., Cheng Y., Chen D., Liu D. The Catalase Gene Family in Cotton: Genome-Wide Characterization and Bioinformatics Analysis // *Cells*. 2019. Vol. 8. N 2. P. 86–114. doi:10.3390/cells8020086
57. Wani K. I., Naeem M., Castroverde C. D. M. et al. Molecular mechanisms of nitric oxide (NO) signaling and reactive oxygen species (ROS) homeostasis during abiotic stresses //

- Plants. Intern. Journ. of Mol. Sci. 2021. Vol. 22. N 17. P. 56–96. <https://doi.org/10.3390/ijms22179656>
58. Zhang X., Zhao Y., Wang S. Responses of antioxidant defense system of epilithic mosses to drought stress in karst rock desertified areas // The Acta Geochimica. 2017. Vol. 36. N 2. P. 205–212. doi 10.1007/s11631-017-0140-z
59. Zulfiqar F., Ashraf M. Antioxidants as modulators of arsenic-induced oxidative stress tolerance in plants: An overview // J. Hazard. Mater. 2021. Vol. 427. P. 1–14. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127891

Стаття надійшла до редакції 13.07.22

доопрацьована 21.09.22

прийнята до друку 27.09.22

MORPHO-PHYSIOLOGICAL REACTIONS OF MOSSES TO THE ACTION OF ABIOTIC FACTORS ON POST-TECHNOGENIC AREAS OF SULPHUR DEPOSIT

O. Baik, N. Kit

*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine
e-mail: baik.oksana@gmail.com*

The morphological structure of turfs and the activity of the main enzymes of antioxidant protection: peroxidase, superoxide dismutase (SOD) and catalase of the dominant species of mosses *Barbula unguiculata* Hedw., *Bryum caespiticium* Hedw., *Bryum argenteum* Hedw. and *Brachythecium salebrosum* (Hoffm. ex F. Weber & D. Mohr) Schimp. from different transects of the northern exposure of sulfur mining dump No. 1 in the summer and autumn seasons were studied.

It is shown that the morphological structure of the turfs of the mosses *Bryum argenteum* and *Brachythecium salebrosum* in the post-technological areas of sulfur mining is important for moisture conservation and depends on the microclimatic conditions of local growth and the life form of the species. It was found that the activity of enzymes depends on the species characteristics of mosses. The dependence of the activity of antioxidant enzymes in the investigated mosses on the intensity of light and temperature on the transects of dump No. 1 was defined. In the summer period, the highest indicators of the activity of antioxidant enzymes were noted in moss samples from the northern top of the dump, where the influence of high temperatures and light intensity, as well as lack of moisture, are particularly noticeable. Under the experimental conditions, in *Barbula unguiculata* and *Bryum caespiticium* from the northern top of the dump, under the influence of 24-hour exposure to a temperature of 42 °C, the most significant increase in peroxidase activity by 1.2–1.4 and SOD by 1.6–1.9 times was found. Increasing in peroxidase activity and SOD caused by hyperthermia were reversed by pretreatment with the protein biosynthesis inhibitor cyclohexamide, that may indicate about involvement of the protein synthesizing system in this process. It is likely that the increasing of the activity of antioxidant enzymes is caused primarily by the change in gene expression of stress proteins that control the synthesis of specific adaptogens and protectors, indicating that the extreme conditions of an anthropogenically transformed environment contribute to the development of forms of organisms with the highest potential opportunities.

Keywords: oxidative stress, peroxidase, superoxide dismutase, catalase, mosses