

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ И ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ

Направление подготовки 06.04.01 Биология
Магистерская программа «Биоресурсы и биоразнообразие»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА
НАСЫБУЛЛИНОЙ ДАРИИ РАФАИЛЕВНЫ

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ
МОХОВИДНЫХ


Работа завершена:

« 03 » 06 2019 г.  (Д. Р. Насыбуллина)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, с. н. с. лаборатории окислительно-
восстановительного метаболизма КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, ассистент
ИФМиБ К(П)ФУ

« 03 » 06 2019 г.  (А. В. Часов)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

« 03 » 06 2019 г.  (Р. М. Сабиров)

Казань – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
РЕФЕРАТ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Моховидные – гаметофитная линия эволюции наземных растений.....	6
1.1.1. Происхождение и жизненный цикл моховидных.....	6
1.1.2. Условия жизни моховидных	10
1.1.3. Практическое значение мхов	11
1.2. Окислительно-восстановительные ферменты	12
1.2.1. Особенности строения и свойства аскорбатпероксидазы.....	13
1.2.2. Особенности строения молекулы пероксидазы.....	14
1.2.3. Свойства пероксидазы	15
1.2.4. Функции пероксидазы в растительном организме	17
1.3. Основные формы активированного кислорода, их образование и свойства	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1. Объекты исследования.....	25
2.1.1. Дикранум метловидный (<i>Dicranum scoparium</i> Hedw.).....	25
2.1.2. Гилокомиум блестящий (<i>Hylocomium splendens</i> Hedw.).....	26
2.1.3. Пилезия многоцветковая (<i>Pylaisia polyantha</i>)	28
2.1.4. Дикранум многоножковый (<i>Dicranum polysetum</i>)	29
2.1.5. Брахитециум (<i>Brachythecium</i> sp.).....	30
2.1.6. Сфагнум магелланский (<i>Sphagnum magellanicum</i>)	31
2.1.7. Плеврозиум Шребера (<i>Pleurozium schreberi</i>)	32
2.2. Методы исследования	33

2.2.1. Подготовка растительного материала. Метод получения ферментативной вытяжки	34
2.2.2. Метод определения активности пероксидазы.....	35
2.2.3. Метод определения каталазной активности.....	35
2.2.4. Метод определения аскорбатоксидазной активности.....	36
2.2.5. Метод определения супероксиддисмутазы (СОД).....	37
2.2.6. Определение интенсивности образования супероксидного анион-радикала.....	37
2.2.7. Разделение на фракции белков клеточной стенки мха <i>Dicranum scoparium</i>	38
2.2.8. Электрофоретическое разделение белков	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1. Активность пероксидазы лесных мхов	40
3.2. Кинетика окислительно-восстановительных ферментов сфагнома магелланского	42
3.3. Влияние температуры на активность мхов. Термостабильная пероксидаза сфагнома магелланского	46
3.4. Влияние тяжёлых металлов на активность антиоксидантных ферментов некоторых видов моховидных.....	52
3.5. Определение интенсивности образования супероксидного анион-радикала	58
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	60
ВЫВОДЫ.....	61
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	63

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: моховидные, *Dicranum scoparium*, *Sphagnum magellanicum*, пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, стрессовые факторы, температурный стресс, регидратация, тяжёлые металлы, активные формы кислорода (АФК).

Проведено исследование влияния различных стрессовых факторов на активность редокс-ферментов различных лесных мхов. Показано возрастание активности экстраклеточной пероксидазы предварительно регидратированного сфагнома магелланского при увеличении продолжительности регидратации, не характерное для экстраклеточной пероксидазы сухого сфагнома. Обнаружено, что сфагнум магелланский обладает термостабильной пероксидазой. Активность пероксидазы данного мха частично сохраняется как после длительной сушки образцов в течение 24 ч при 105°C, так и после кипячения ферментативного экстракта в течение 5-30 минут. Обнаружено, что уровень активности таких антиоксидантных ферментов, как каталаза и супероксиддисмутаза не имеет существенных отличий у образцов мхов, собранных в районах с различной экологической нагрузкой. Показано, что среди исследованных мхов наивысшей пероксидазной активностью обладает *D. scoparium*. Обнаружено достоверное повышение пероксидазной активности в образцах, собранных в Биклянском лесничестве – в районе неблагоприятном по выбросу тяжёлых металлов в атмосферу. Таким образом, пероксидаза может быть использована как стрессовый маркер при экологическом мониторинге загрязнённых тяжёлыми металлами районов. Показано образование супероксидного анион-радикала изоферментами пероксидазы дикранума метловидного, что указывает на проявление одними и теми же изоферментами данной пероксидазы как прооксидантных, так и антиоксидантных свойств.

Выпускная квалификационная работа изложена на 76 страницах, содержит 31 рисунок, 2 таблицы и 121 источник литературы.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что мхи отличаются чрезвычайной стрессоустойчивостью. Например, они способны выживать при потере большого количества воды. Такая феноменальная особенность сохранять жизнеспособность не должна была остаться без внимания стрессологов. Несмотря на очевидную важность, биохимические механизмы окислительно-восстановительных реакций в клетках мхов недостаточно изучены (Lehtonen et al., 2012).

Известно, что активирование окислительно-восстановительных ферментов может происходить в различных органах и тканях растений и при воздействии разнообразных стрессоров как абиотической, так и биотической природы. Пероксидаза является одним из стрессовых маркеров растений. Можно полагать, что выявление особенностей структуры и функции пероксидаз моховидных, стоящих на более низкой эволюционной ступени развития, чем цветковые растения, может помочь в понимании происхождения и особенностей функционирования стресс-чувствительных пероксидаз сосудистых растений.

Цель исследования – выявление закономерностей функционирования окислительно-восстановительных ферментов различных видов мхов при воздействии стрессовых факторов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить активность пероксидазы дикранума метловидного, гилокомиума блестящего и плеврозиума Шребера, а также выявить влияние регидратации на активность экстраклеточной пероксидазы сфагнума магелланского.
2. Исследовать влияние стресса, вызванного воздействием высоких и низких температур, на пероксидазную активность сфагнума магелланского и дикранума метловидного, а также исследовать зависимость активности пероксидазы сфагнума от температуры.
3. Исследовать влияние тяжёлых металлов на активность антиоксидантных ферментов различных лесных мхов.

4. Определить способность пероксидаз таллома дикранума метловидного к проявлению прооксидантных свойств.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Моховидные – гаметофитная линия эволюции наземных растений

1.1.1. Происхождение и жизненный цикл моховидных

Известно, что эмбриофиты (архегионаты, или высшие растения) – принципиально новый относительно водорослей структурно-функциональный тип (Рыковский, 2001). В далёком прошлом они перешли в наземные, гораздо более сложные условия существования. Три филы эмбриофитов объединены в надотдел моховидных; они возникли одними из первых среди наземных растений. Моховидные, несомненно, сыграли важную биотопообразующую роль в заселении растениями суши (Троицкий с соавт., 2007). Авторы считают, что «время возникновения моховидных по палеонтологическим данным точно не установлено, что связано с плохой их сохранностью в отложениях и редкостью находок спорофитов, однако возраст спор, которые могут быть отнесены к этому надотделу, составляет 440 - 450 млн лет». Кладистический анализ морфологических признаков установил монофилию наземных растений, ближайшими предками которых были харовые водоросли, и парафилию трёх монофилетичных отделов моховидных, образующих граду, предшествующую сосудистым растениям (Whittemore, 1987). Несмотря на это, результаты молекулярно-генетических исследований показывают, что моховидные монофилетичны (рисунок 1). Сравнительно простое строение таллома печёночниковых, вероятно, связано с утратой признаков их предков в процессе эволюции (Puttick, 2018).

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено повышение активности пероксидазы в ряду плеврозиум Шребера – гилокомиум блестящий – дикранум метловидный. Показано возрастание активности экстраклеточной пероксидазы предварительно регидратированного сфагнума магелланского при увеличении продолжительности регидратации, не характерное для экстраклеточной пероксидазы сухого сфагнума.
2. Доказано частичное сохранение пероксидазной активности сфагнума магелланского даже после воздействия высоких температур. Выявлено возрастание активности частично очищенной пероксидазы высушенного в течение суток при +105°C сфагнума с повышением температуры. Показан рост пероксидазной активности дикранума после кратковременного стресса, вызванного воздействием как высоких, так и низких температур, а также снижение активности этого фермента при длительном стрессе, связанном с влиянием аналогичных факторов.
3. Обнаружено, что уровень активности таких антиоксидантных ферментов, как каталаза и супероксиддисмутаза не имеет существенных отличий у образцов мхов, собранных в районах с различной экологической нагрузкой. Показано, что среди исследованных мхов наивысшей пероксидазной активностью обладает *D. scoparium*. Обнаружено достоверное повышение пероксидазной активности в образцах, собранных в Биклянском лесничестве г. Нижнекамска – в районе, неблагоприятном по выбросу тяжёлых металлов в атмосферу. Таким образом, пероксидаза может быть использована как стрессовый маркер при экологическом мониторинге загрязнённых тяжёлыми металлами районов.
4. Показано образование супероксидного анион-радикала изоферментами пероксидазы дикранума метловидного, что указывает на проявление

одними и теми же изоферментами данной пероксидазы как прооксидантных, так и антиоксидантных свойств.