

І. В. Косаківська, Л. М. Бабенко, А. Ю. Устінова, Т. Д. Скатерна,  
К. Деміревська

## Вплив температурного режиму на активність ліпоксигенази проростків ріпаку *Brassica napus* var. *Oleifera*

(Представлено членом-кореспондентом НАН України О. П. Дмитрієвим)

*Досліджено вплив температурного режиму на активність ліпоксигенази проростків контрастних за термостійкістю сортів ріпаку Brassica napus var. Oleifera. Виявлено дві стресозалежні ізоформи мембранозв'язаної ліпоксигенази з різними значеннями оптимумів рН. Встановлено кореляцію між величиною ліпоксигеназної активності і термостійкістю досліджених сортів ріпаку.*

Температурний режим є одним із вирішальних факторів довкілля, який впливає на процеси росту і розвитку, урожайність провідних аграрних культур. Гіпо- і гіпертермія викликають дестабілізацію метаболічних процесів. Вважають, що реакції на стресові впливи забезпечують короточасний захист рослини, а в подальшому сприяють формуванню механізмів спеціалізованої адаптації [1]. Серед компонентів, задіяних у формуванні адаптивних реакцій на дію абіотичних стресів, важливе значення надають фізіологічно активним (сигнальним) продуктам катаболізму [2], зокрема ферменту ліпоксигенази (ЛОГ) [3, 4]. ЛОГ каталізує приєднання молекулярного кисню до цис-цис-1,4-пентадієнової системи в молекулах лінолевої, ліноленової й арахідонової кислот [2–5]. Активність ЛОГ розглядають як біологічний маркер фізіологічного стану рослини [4]. Показано, що дія високої температури, іонізуючого випромінювання, озону, іонів кальцію, пероксиду водню тощо викликає зростання активності ЛОГ [2, 3]. Пригнічення активності ЛОГ спостерігається після дії низької температури, поліамінів, абсцизової і фумарової кислот [6, 7]. Інтенсифікація метаболізму ЛОГ в стресових умовах відбувається як за рахунок активації вже існуючих у клітинах форм ферменту, так і в результаті збільшення їхнього вмісту [8]. Показано, що під впливом водного дефіциту, високих температур, патогенів зростає вміст мРНК, яка кодує синтез різних форм ЛОГ [9].

Ми ставили за мету дослідити вплив температурного режиму на активність ліпоксигенази в проростках контрастних за термостійкістю сортів ріпаку *Brassica napus* var. *Oleifera*, однорічної олійної рослини родини хрестоцвітих. Завдяки можливості ефективного використання ріпаку для виготовлення біопалива, останні десятиліття ця культура займає значні посівні площі в Європі [10].

**Матеріали і методи.** Насіння жаро- й посухостійкого сорту ріпаку Тріангел і холодостійкого сорту Мілена було відкаліброване й перенесене до чашок Петрі на фільтрувальний папір, зволожений дистильованою водою. Перші дві доби насіння пророщували в термостаті при 22 °С в умовах постійної темряви, після чого переносили на світло (фотоперіод: 15 год — світло; 9 год — темрява; освітлення 3500 лк). Щодоби в чашки з проростками додавали по 1 мл дистильованої води. Для моделювання теплового й холодового стресів семидобові проростки протягом 2 год піддавали дії температур у 40 та 4 °С.

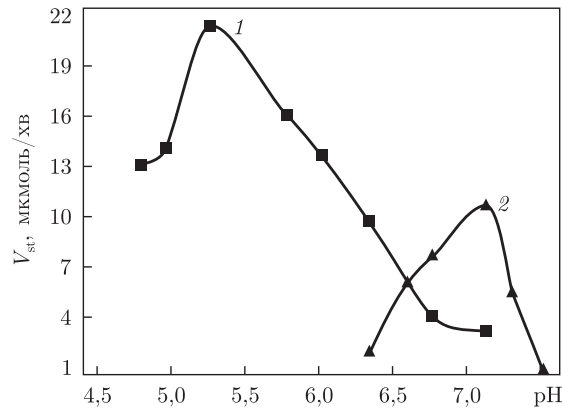


Рис. 1. Залежність стаціонарної швидкості реакції ( $V_{st}$ ) окиснення лінолевої кислоти ліпоксигеназою в листках ріпаку сортів Мілена (1) і Тріангел (2)

Для виділення ЛОГ рослинні тканини гомогенізували в охолоджену до  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $0,1\text{ M}$  фосфатному буфері (рН 6,3), який містив  $2\text{ mM}$  ФМСФ (фенілметилсульфонілфторид). Гомогенат центрифугували на центрифугі (“WPW-310”, ПНР) при  $10\,000\text{ об/хв}$  протягом  $30\text{ хв}$ . Отриманий супернатант використовували для визначення активності ЛОГ. Вміст білка визначали за методом Бредфорд [11]. Кінетичні вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ 46 (Росія).

Для побудови кривих рН-залежності стаціонарних швидкостей реакції ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти використовували такі буферні розчини:  $0,1\text{ M}$  Na-ацетатний (рН 4,0–5,5);  $0,1\text{ M}$  Na-фосфатний (рН 6–8);  $0,1\text{ M}$  боратний (рН 8,0–9,5). Стандартна реакційна суміш ( $2,5\text{ мл}$ ) для сорту Тріангел містила  $100\text{ мкМ}$  лінолевої кислоти й  $0,02\%$  лубролу РХ в  $0,1\text{ M}$  Na-фосфатному буфері (рН 7,04) [12]. Реакцію ініціювали шляхом додавання  $20\text{--}30\text{ мкл}$  розчину ферменту (концентрація білка  $1,4\text{--}1,9\text{ мг/мл}$ ) і проводили за умов постійної температури ( $25 \pm 0,1$ )  $^{\circ}\text{C}$ . За перебігом реакції спостерігали, враховуючи збільшення оптичної густини реакційної суміші при  $\lambda = 235\text{ нм}$ , що відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду ліноленової кислоти, молярний коефіцієнт поглинання якого становить  $23000\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [13]. Для сорту Мілена реакційна суміш містила  $100\text{ мкМ}$  лінолевої кислоти й  $0,02\%$  лубролу РХ в  $0,1\text{ M}$  Na-ацетатному буфері (рН 5,3).

Усі досліди проводили у двох біологічних і трьох аналітичних повторах. Результати статистично обробляли за допомогою програм “Excel 2002”, “Origin 6.0”. Відмінності результатів, що обговорюються в роботі, вірогідні за рівня значення  $p \leq 0,05$  за критерієм Стьюдента.

**Результати і обговорення.** При дослідженні активності ЛОГ у проростках контрастних за термостійкістю сортів ріпаку нами виявлені дві стресозалежні ізоформи мембранозв’язаної 9-ЛОГ, які мали різні значення оптимумів рН. Аналіз залежності стаціонарної швидкості ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти від рН середовища виявив, що рН-оптимум у жаро- й посухостійкого сорту Тріангел становив  $7,04$ , тоді як у холодостійкого сорту Мілена —  $5,3$  (рис. 1). Встановлено, що на активність ЛОГ істотно впливав температурний режим. Після короткочасного холодового стресу активність ЛОГ жаростійкого сорту Тріангел значно зменшувалась (на  $34\%$ ), тоді як після короткочасного теплового стресу вона практично не змінювалась (табл. 1). Водночас активність ЛОГ холодостійкого

Таблиця 1. Активність ліпоксигенази листків сортів ріпаку після дії короткотривалих температурних стресів

Умови досліджу	Сорт Триангел		Сорт Мілена	
	мкмоль гідропероксиду лінолевої кислоти/ (хв · мкг білка)	% від контролю	мкмоль гідропероксиду лінолевої кислоти/ (хв · мкг білка)	% від контролю
Контроль (22 °С)	13,10 ± 0,08	100	42,02 ± 1,12	100
Тепловий стрес (+40 °С, 2 год)	12,3 ± 0,09	94	23,67 ± 1,49	56
Холодовий стрес (+4 °С, 2 год)	8,6 ± 0,07	66	40 ± 1,67	97

сорту Мілена після короткочасного теплового стресу зменшувалась майже вдвічі, а після короткочасного холодового — майже не змінювалась (див. табл. 1).

Таким чином, ми встановили кореляцію між активністю ЛОГ і терморезистентністю у досліджених сортів ріпаку. Виявлені зміни у ферментативній активності вказують на участь ЛОГ у формуванні адаптивної реакції рослини на температурні стреси. У зв'язку з цим при дослідженні клітинних механізмів формування адаптаційного синдрому активність ЛОГ пропонується розглядати як можливий біомаркер термостійкості.

*Робота виконана відповідно до завдань проекту із двостороннього наукового співробітництва між Інститутом ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України та Інститутом фізіології рослин і генетики ім. М. Попова Болгарської академії наук (тема: “Білки як біомаркери стійкості рослин”, 2007–2011 рр.).*

1. Пятыгин С. С. Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общей биологии. – 2008. – **69**, № 4. – С. 294–311.
2. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов. – Киев: Основа, 2010. – 350 с.
3. Grechkin A. N. The lipoxygenase signaling system // Rus. J. Plant Physiol. – 1999. – **46**, No 1. – P. 114–123.
4. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. – Москва: Наука, 2002. – 294 с.
5. Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes / Ed. G. Piazza. – Champaign, IL: AOCS Press, 1996. – 2248 p.
6. Жеребцов Н. А., Попова Т. Н., Зяблова Т. В. Фумаровая кислота – конкурентный ингибитор липоксигеназы пшеничных зародышей // Биохимия. – 2000. – **21**, № 5. – С. 727–729.
7. Nemchenko A., Kunze S., Feussner I., Kolomiets M. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments // J. Exp. Bot. – 2006. – **57**, No 14. – P. 3767–3779.
8. Laxalt A. M. Phospholipid signalling in plant defence // Curr. Opin. Plant Biology. – 2002. – **5**, No 4. – P. 332–338.
9. Maccarone M., Veldink G. A., Finazzi Atro A. et al. Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit // FEBS Lett. – 1995. – **371**. – P. 223–226.
10. Palz W., Chartier P. Energy from biomass in Europe. – London: Applied Sci., 2008. – 340 p.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, No 2. – P. 248–254.
12. Бутович И. А., Цысь Е. В., Могилевич Т. В. Окисление линолевой кислоты и метиллинолеата липоксигеназами из картофеля и соевых бобов (сравнительная характеристика) // Биохимия. – 1992. – **57**, вып. 10. – С. 1472–1480.

13. Gibtan M., Vanderberger B. Product yield on oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: the value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay // Anal. Biochem. – 1987. – **163**, No 2. – P. 343–349.

*Институт ботаніки ім. М. Г. Холодного*

*НАН України, Київ*

*Институт біоорганічної хімії та нафтохімії*

*НАН України, Київ*

*Институт фізіології рослин і генетики ім. М. Попова*

*Болгарської академії наук, Софія*

*Надійшло до редакції 29.11.2011*

**И. В. Косаковская, Л. М. Бабенко, А. Ю. Устинова, Т. Д. Скатерная,  
К. Демиревская**

**Влияние температурного режима на активность липоксигеназы проростков рапса *Brassica napus* var. *Oleifera***

*Исследовано влияние температурного режима на активность липоксигеназы проростков контрастных по термоустойчивости сортов рапса *Brassica napus* var. *Oleifera*. Определены две стрессозависимые изоформы мембранно-связанной липоксигеназы с разными значениями pH оптимумов. Установлена корреляция между величиной липоксигеназной активности и термоустойчивостью изученных сортов рапса.*

**I. V. Kosakivska, L. M. Babenko, A. Yu. Ustinova, T. D. Skaterna,  
K. Demirevska**

**The influence of temperature conditions on lipoxygenase activity in seedling of rape *Brassica napus* var. *Oleifera***

*The influence of the temperature regime on the lipoxygenase activity in two varieties of rape, which differ in thermotolerance, is investigated. Two different isoforms of membrane-associated lipoxygenases with different pH optima are found. The correlation between the lipoxygenase activity and the thermostability of rape varieties has been determined.*