



І.В. КОСАКІВСЬКА, О.О. КОНТУРСЬКА, А.Ю. УСТІНОВА

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, МСП-1, м. Київ, 01601, Україна

**ВПЛИВ ГІПО- І ГІПЕРТЕРМІЇ НА
АКТИВНІСТЬ ЛІПОКСИГЕНАЗИ В
ЛИСТКАХ РОСЛИН РІЗНИХ ТИПІВ
ЕКОЛОГІЧНИХ СТРАТЕГІЙ**

Ключові слова: Brassica campestris, Amaranthus caudatus.,
Rumex patientia × R. tianshanicus, Festuca pratensis, ліпоксигеназа,
температурний режим, екологічна стратегія

Вивчення впливу стресових факторів на рослини є однією з актуальних проблем сучасної біології. Явища глобального потепління, засолення й забруднення ґрунтів, техногенні катастрофи надають цьому питанню особливого значення. Пристосувальні зміни, які відбуваються під дією екологічних стресорів, досліджуються на різних ієрархічних рівнях – від ценотичного до молекулярного (Косаківська, 2003). Фізіологічні параметри рослин за умов абіотичних і біотичних стресів змінюються в межах формування конкретних екологічних стратегій. Широкого визнання набула двовимірна класифікація рослин (Grime, 1974), заснована на особливостях реалізації цілісного адаптивного комплексу. Відповідно до неї виокремлюють три групи рослин: віоленти, пацієнти й експлеренти. Віоленти однаково нестійкі до дії стресів та відхилень від нормальних умов існування. У них відсутні спеціальні пристосування для виживання за несприятливих екологічних чинників. Ці рослини характеризуються потужним розвитком органів поглинання, що забезпечує найефективніше використання ресурсів. Основою адаптивного процесу у віолентів є підтримка вегетативного росту за помірного екологічного стресу. Пацієнти стійкі до дії стресів, що

обумовлено функціонуванням спеціальних фізіологічних механізмів, можуть існувати навіть за обмежених ресурсів. У разі стресового стану припиняють видимий ріст, уповільнюють перехід до цвітіння, ресурси рослини спрямовуються на процеси адаптації. Експлеренти чутливі до дії абіотичних та біотичних стресових факторів. Їхнє виживання забезпечується суттєвим скороченням тривалості життєвого циклу та активною репродукцією. Розподіл на групи враховує співвідношення величини потенційного росту до розмірів реально реалізованої рослини (Миркин и др., 1999).

Такі стресові фактори, як посуха, засолення, низькі та високі температури, хімічні забруднення тощо, зазвичай взаємодіють і спричиняють формування у рослин адаптивних і захисних реакцій (Vinocur, Altman, 2005). Особливу увагу привертає вивчення адаптивних перетворень білків у відповідь на дію аномальних екологічних чинників (Косаковская, 2008). За стресових умов у клітинах рослин відбувається запуск різноманітних сигнальних систем. Уже накопичено достатньо інформації, щоб вважати ліпоксигеназний шлях перетворення мембранних ліпідів самостійною сигнальною системою (Тарчевский, 2002). Ліпоксигенази (КФ 1.13.11.12) каталізують приєднання молекулярного кисню до одного з атомів вуглецю цис-, цис-пентадієнового радикалів жирних кислот із утворенням високоактивних оксиліпінів (Porta, 2002). Один із метаболітичних шляхів перетворення оксиліпінів зумовлює утворення жасмонової кислоти, основна функція якої — трансдукція сигналів й експресія генів, що беруть участь у формуванні захисних реакцій (Creelman, Mullet 1997).

Порівняльне вивчення ферментів, зокрема ліпоксигенази, у рослин із різними типами екологічних стратегій, які зазнали впливу високих та низьких температур, практично не проводилося (Kosakivska et al, 2008). Тому метою цієї роботи було дослідження активності ліпоксигенази у рослин різних типів екологічних стратегій у контролі та порівняння впливу на її величину короточасної дії гіпо- і гіпертермії.

Матеріали та методи дослідження

При визначенні об'єктів для вивчення акцентували на відборі нових перспективних кормових та енергоємних культур місцевої флори й інтродуцентах. Насіння досліджуваних рослин, а також відомості про їхні біологічні особливості нам люб'язно надав д-р с.-г. наук Д.Б. Рахметов (ЦБС ім. М.М. Гришка НАН України). Як експлеренти були відібрані рослини *Brassica campestris* var. *olifera* (однорічна культура із С-3 типом фотосинтезу) та *Amaranthus caudatus* L. (однорічна культура із С-4 типом фотосинтезу). За патієнт ми обрали нову багаторічну культуру — гібрид *Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los., яка характеризується високою екологічною пластичністю. Як віолент вивчали рослину *Festuca pratensis* Huds.

Насіння відібраних видів було відкаліброване й перенесене до чашок Петрі на фільтрувальний папір, зволожений дистильованою водою. Перші дві доби насіння пророщували в термостаті за температури 22 °С в умовах постійної темряви, відтак виставили на світло (фотоперіод: 15 год. — світло; 9 год. —

темрява; освітлення — 3500 люкс). Щодоби в чашки із проростками додавали по 1 мл дистильованої води.

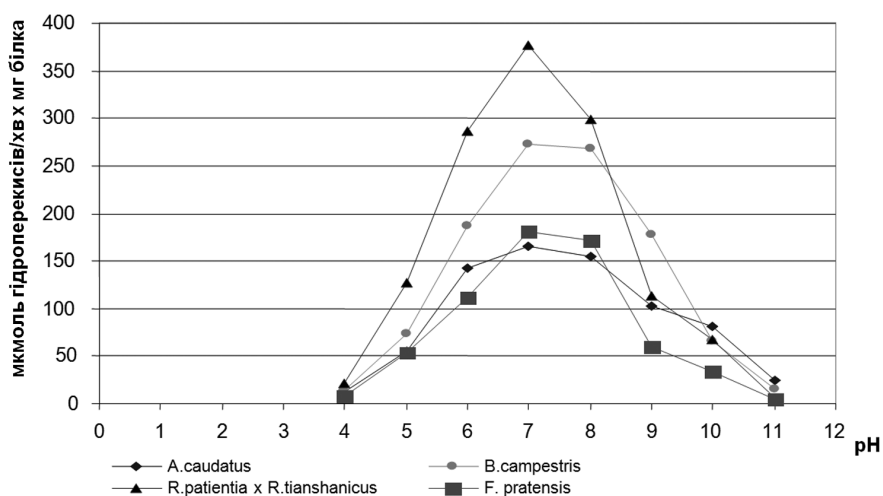
Для моделювання теплового й холодового стресів семидобові проростки впродовж 2 год. зазнавали дії температур 40 °С і 4 °С. Після чого відібрані наважки надземної частини проростків (по 100 мг у трьох повторах) заморожували за температури –82 °С. Для визначення ліпоксигеназної активності заморожені проростки розтирали в порцеляновій ступці з охолодженням 0,1 М калій-фосфатним буфером (рН 7,3), який містив 1 % Тритону Х-100 та 0,04 % натрій метабісульфіту, у ваговому співвідношенні 1:3. Гомогенат центрифугували 30 хв. при 10000 g на центрифугі JOUAN (Франція). Одержаний супернатант використовували для спектрофотометричного визначення ліпоксигеназної активності на спектрофотометрі СФ-2000 (Росія) за довжини хвилі 234 нм. Субстратом слугувала лінолева кислота («Sigma», США). Стандартний розчин субстрату містив 30 мкл лінолевої кислоти та 0,1 мл Tween-20 у 20 мл 0,1 М калій-фосфатного буфера, рН 7,3. Для вимірювання активності до 1 мл стандартного розчину додавали 2 мл буфера та 50 мкл супернатанту. За нульову точку було обрано оптичну густину реакційної суміші без супернатанту. Активність розраховували за коефіцієнтом екстинції гідроперекису 25000 М⁻¹ см⁻¹ і репрезентували в мкмоль гідроперекисів/ хв. × мг білка (Morton, 1987). Для визначення залежності активності ферменту від рН середовища використовували ацетатний (рН 4—6) й калій-фосфатний буфери (рН 7—11). Вміст білка встановлювали за методом (Breadford, 1976).

Усі досліди проводили в чотирьох біологічних і трьох аналітичних повторах. Статистично обробляли результати 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 досліджень та їх обговорення

Аналіз залежності ліпоксигеназної активності в листках рослин із різними типами екологічних стратегій від рН середовища виявив, що оптимум рН усіх вивчених видів міститься в інтервалі рН 7 (рисунок).

Найвищий показник ліпоксигеназної активності в листках за умов контролю зафіксовано у проростках пацієнта *R. patientia* × *R. tianshanicus* (таблиця). Ця рослина характеризувалася збереженням величини ліпоксигеназної активності після зміни температурних режимів. Проростки віолента *F. pratensis* мали найменші показники ліпоксигеназної активності в контролі, яка суттєво знижувалася після дії високої (на 31%) та низької (на 41 %) температур. У листках експлерента із С-4 типом фотосинтезу *A. caudatus* досліджуваній показник зростав на 76 % і 46 % за дії високої та низької температур відповідно. Експлерент із С-3 типом фотосинтезу *B. campestris* характеризувався вищою ліпоксигеназною активністю в контролі порівняно з *A. caudatus*. Низька температура не вплинула на ліпоксигеназну активність у листках, тоді як висока — спричинила незначне зниження активності ферменту (таблиця).



Залежність ліпоксигеназної активності в листках досліджуваних рослин від рН середовища реакції

Ліпоксигеназна активність у листках проростків рослин із різними типами екологічних стратегій за різних температурних режимів

Рослина	Температурний режим					
	Контроль 22 °С		40 °С, 2 год		4 °С, 2 год	
	мкмоль/хв × мг білка	%	мкмоль/хв × мг білка	%	мкмоль/хв × мг білка	%
<i>Amaranthus caudatus</i>	165,72±12,34	100	292,32±14,13*	176	242,16±11,42*	146
<i>Brassica campestris</i>	272,50±14,56	100	233,48±19,14	86	268,94±22,15	99
<i>Rumex patientia</i> × <i>R. tianshanicus</i>	377,59±15,22	100	371,88±13,15	98	354,89±8,24	94
<i>Festuca pratensis</i>	180,36±4,24	100	124,48±3,15*	69	103,88±7,21*	56

Примітка: М±m, n=4, p<0,05; * — достовірно щодо контролю

Зміни ліпоксигеназної активності відзначені і в інших рослинах під впливом різних стресових факторів. Активність цього ферменту посилювалася за механічного пошкодження рослин (Geerts, 1994, Heitz, 1997), дії патогенів

(Kolomiets, 2000), високих температур, озону, водного дефіциту (Massarone, 1992, 1995, 1997), засоленні (Delaplace, 2009). Існує думка, що інтенсифікація ліпоксигеназного метаболізму сприяє адаптаційним процесам та формуванню імунітету в рослинах, тоді як його послаблення, можливо, гальмує реакції рослин на дію стресових факторів (Гречкин, 1999). Високі та низькі температури навколишнього середовища є одним з абіотичних стресових чинників, які впливають на ріст, розвиток, фізіологічні та біохімічні характеристики рослин, їхню продуктивність. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що після дії температурних стресів змінюються кількісні та якісні характеристики розчинних білків клітин листка досліджуваних видів, які корелювали з особливостями їхніх екологічних стратегій (Косаковская и др., 2010). Одержані нами результати про зміни ліпоксигеназної активності за умов гіпо- і гіпертермії у віолента *F. pratensis* продемонстрували чутливість цього виду до впливу температурного стресового чинника. Патієнт *R. patientia* × *R. tianshanicus*, навпаки, виявив стійкість до дії високої та низької температур, що, загалом, відповідає рисам екологічних стратегій цих рослин. Дослідження рослин, які мають однакову екологічну стратегію, але відрізняються за біохімічною стратегією, засвідчили, що ліпоксигеназний метаболітний шлях *A. caudatus* активно реагує на зміну температурного режиму.

Висновки

Таким чином, порівняльне вивчення ліпоксигеназної активності в нормі та після короткотривалих гіпо- і гіпертермії виявило особливості в реакції досліджуваних видів із різними типами екологічних стратегій на зміни температурного режиму. Отримані результати корелюють із характеристикою екологічної стратегії розглянутих видів. Найчутливішою до температурних впливів виявилась активність ліпоксигенази віолента *F. pratensis*, тоді як активність ферменту патієнта *R. patientia* × *R. tianshanicus* була найстійкішою.

Автори висловлюють щире подяку членові-кореспондентові НАН України Я.П. Дідуху за наукове обговорення і консультації щодо визначення екологічних стратегій досліджених видів.

1. Гречкин А.Н., Тарчевский И.А. Липоксигеназная сигнальная система // Физиология растений. — 1999. — 46, № 1. — С. 132—142.

2. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. — К.: Сталь, 2003. — 191 с.

3. Косаковская И.В. Стрессовые белки растений. — Киев: Укрфитосоциолцентр, 2008. — 151 с.

4. Косаковская И.В., Климчук Д.А., Блюма Д.А., Демиревская К., Устинова А.Ю. Влияние температурных стрессов на белки и ультраструктуру растений с разными типами экологических стратегий // Вісн. Харків. НАУ. Серія біологія. — 2010. — Вип. 1 (19). — С. 34—43.

5. Муркин Б.М., Усманов И.Ю., Наумова Л.Г. Типы стратегий растений: место в системах видовых классификаций и тенденции развития // Журн. общ. биологии. — 1999. — **60**, № 5. — С. 581—595.
6. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
7. 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** (2). — P. 248—254.
8. Creelman R.A., Mullet J.E. Biosynthesis and action jasmonates in plant // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1997. — **48**. — P. 355—381.
9. Delaplace P., Frettinger P., Ghanem M.E. Blondiaux Lipoxygenase pathway and antioxidant system in salt stressed tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // Biotechnol. Agron. Environ. — 2009. — **13**. — P. 525—536.
10. Geerts A., Felkamp D., Rosahl S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers *Solanum tuberosum* L. // Plant Physiol. — 1994. — **105**. — P. 269—277.
11. Grime J.P. Vegetation classification by reference to strategies // Nature. — 1974. — **250**. — P. 26—31.
12. Heitz T., Bergey D.R., Ryan C.A. A gene encoding a chloroplast — targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin and methyl jasmonate // Plant Physiol. — 1997. — **114**. — P. 1085—1093.
13. Kolomiets V.M., Chen H., Gladon R.J. et al. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection // Plant Physiology. — 2000. — **124**. — P. 1121—1130.
14. Kosakivska I.V. Biomarkers of plants with different types of ecological strategies // Gen. Appl. Plant Physiol. — 2008. — Spec. issue — **34** (1—2). — P. 113—126.
15. 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.
16. Maccarone M., Veldink G.A., Vliegenthart J.F. et al. Ozone stress modulates amine oxidase and lipoxygenase expression in lentil (*Lens culinaris*) seedlings // FEBS Letters. — 1997. — **408**. — P. 241—244.
17. Maccarone M., Veldink G.A., Vliegenthart J.F. Thermal injury and ozone stress affect soybean lipoxygenase expression // FEBS Lett. — 1992 — **309**. — P. 225—230.
18. Morton M. J., Vanderberg P. Product yield in oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: The value of the molar extinction coefficient in the spectrophometric assay // Analyt. Biochem. — 1987. — **163**. — P. 343—349.
19. Porta H., Rocha-Sosa M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features // Plant Physiol. — 2002. — **130**. — P. 15—21.
20. Vinocur B., Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitation // Current Opinion in Biotechnol. — 2005. — **16**. — P. 123—132.

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 24.06.2011

И.В. Косаковская, О.А. Контурская, А.Ю. Устинова

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ТИПОВ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СТРАТЕГИЙ

Проанализирована величина активности липоксигеназы в контроле и после кратковременного воздействия гипо- и гипертермии у растений разных типов экологических стратегий. Самый высокий уровень исследованного показателя в контрольных условиях зафиксирован в листьях пациента *Rumex patientia* × *R. tianshanicus*. Проростки виолента *Festuca pratensis* характеризовались самым низким значением липоксигеназной активности в норме и существенным уменьшением ее после изменения температурного режима. Активность липоксигеназы в листьях эксплорента с С-4 типом фотосинтеза *Amaranthus caudatus* после действия низкой и высокой температуры возростала. У эксплорента с С-3 типом фотосинтеза *Brassica campestris* влияние температуры на данный показатель не выявлено. Обсуждается корреляция между характером изменений активности липоксигеназы и типами экологических стратегий исследованных видов растений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Brassica campestris*, *Amaranthus caudatus*, *Rumex patientia* × *R. tianshanicus*, *Festuca pratensis*, *липоксигеназа*, *температурный режим*, *экологическая стратегия*.

I.V. Kosakivska, O.O. Konturska, A.Yu. Ustinova

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

HYPO- AND HYPERTHERMIA EFFECT ON LIPOXYGENASE ACTIVITY IN LEAVES OF PLANTS WITH DIFFERENT ECOLOGICAL STRATEGIES

We analyzed changes in level of lipoxygenase activity in leaves of plants with different types of ecological strategy under high and low temperature. The highest level of lipoxygenase activity in control conditions was revealed in patient *Rumex patientia* × *R. tianshanicus* leaves. The lowest lipoxygenase activity in violent *Festuca pratensis* leaves was furthermore reduced after the temperature change. In explerent with C-4 type of photosynthesis *Amaranthus caudatus* the enzyme activity increased under low and high temperature. The change in temperature conditions had no effect on lipoxygenase activity in explerent with C-3 type of photosynthesis *Brassica campestris*. Correlation between the change in lipoxygenase activity and ecological strategy of the investigated plants is discussed.

К e y w o r d s: *Brassica campestris*, *Amaranthus caudatus*, *Rumex patientia* × *R. tianshanicus*, *Festuca pratensis*, *lipoxygenase*, *temperature*, *ecological strategy*.