



УДК 577.151.63

© 2011

В. М. Копіч, О. В. Харченко

Вивчення впливу сольового стресу та абсцизової кислоти на активність ліпоксигеназ кукурудзи

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

Досліджено вплив сольового стресу та абсцизової кислоти (АБК) на активність ліпоксигеназ (ЛОГ) кукурудзи (9- й 13-ЛОГ). Показано зміни ЛОГ активності при дії АБК і сольового стресу. Обговорюється можливий шлях залучення ЛОГ метаболітів до формування клітинної відповіді при дії сольового стресу.

При дії на рослини несприятливих факторів середовища (засолення або затоплення ґрунтів, водний дефіцит, посуха) змінюються метаболічні процеси та активуються захисні механізми рослинної клітини. Стрес пригнічує ріст і розвиток рослин та призводить до зниження їх продуктивності. Ферменти та продукти ліпоксигеназної сигнальної системи відіграють значну роль у формуванні адаптації рослини до дії стресових чинників [1, 2]. За умов дії осмотичного стресу в рослині нагромаджується абсцизова кислота (АБК), що зумовлює зміни в регуляції експресії генів та в метаболізмі клітини [3]. На сьогодні не з'ясовано роль фітогормону АБК у регуляції ліпоксигеназної активності в рослинах, але є лише окремі дані про вплив АБК на ліпоксигенази [2, 4, 5].

Метою даної роботи було встановлення впливу сольового стресу та дії фітогормону АБК на рослину в регуляції ліпоксигеназного шляху перетворення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК).

У ході дослідження використовували лінолеву кислоту (ЛК), Lubrol PX, ("Sigma", США); етилендіамінтетраоцтову кислоту ("Reanal", Угорщина). Решта реактивів виробництва країн СНД мали кваліфікацію "х. ч." або "о. ч.". За біологічний об'єкт брали проростки гібриду кукурудзи "Товерла МВ".

Зерна кукурудзи пророщували впродовж 5 діб у термостаті при температурі $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ без освітлення. На добу проростки переносили у 0,2 моль/л розчин хлориду натрію (сольовий стрес), а контрольні рослини вирощували на дистильованій воді. Проросток препарували, скальпелем відділяли мезокотиль. В іншій серії експериментів частинки 5-добових проростків витримували впродовж 0,33–8 год у розчині 10 мкмоль/л АБК. Згідно з раніше

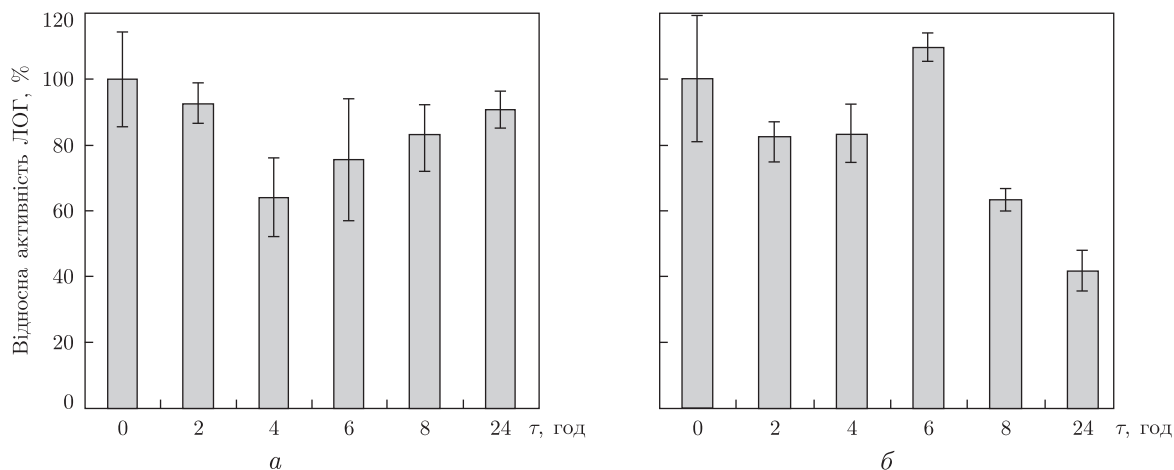


Рис. 1. Залежність активності 9- (а) й 13-ліпоксигенази (б) у проростках кукурудзи (мезокотиль) від часу дії 0,2 моль/л NaCl.

Тут і на рис. 2: активність ферменту визначено у 0,1 моль/л Na-фосфатному буферному розчині (рН 6,0); 0,02% Lubrol PX; 0,1 ммоль/л ЛК (9-ЛОГ) та у 0,1 моль/л Na-фосфатному буферному розчині (рН 7,0); 0,02 ммоль/л ЛК (13-ЛОГ). За 100% прийнято активність ферменту в контрольних рослинах

опублікованими даними [6], було встановлено активність ліпоксигеназ; методом Бредфорда визначено концентрацію білка.

Статистичний аналіз даних включав визначення $M \pm m$ (M — середня величина, m — її стандартна похибка), кількість біологічних повторів $n = 3-6$.

На сьогодні не викликає сумнівів участь ЛОГ у процесах розвитку та стійкості до стресів рослин, але молекулярні механізми цих процесів остаточно нез'ясовано. Ключовий фермент біосинтезу жасмонової кислоти — 13-ЛОГ, її активність визначає внутрішньоклітинний рівень жасмонової кислоти та контроль процесів, що індукуються цим фітогормоном. Роль деяких з метаболітів іншого ферменту каскаду ПНЖК — 9-ЛОГ на даний час є ще невідомою. В ліпоксигеназному каскаді задіяно гідропероксидліази вищих рослин, що каталізують реакції перетворення первинних продуктів ліпоксигеназних реакцій — 9-гідропероксиінолевої й 9-гідропероксиіноленової кислот у C_9 -альдегіди й C_9 -альдокислоти, а 13-гідропероксиінолевої й 13-гідропероксиіноленової кислот у C_6 -альдегіди й C_{12} -альдокислоти. Відомостей про фізіологічну дію 9-вуглецевих сполук та подальші їх перетворення майже нема, в той час як 6- й 12-вуглецеві сполуки достатньо мірою вивчено. Показано, що оксиліпіни — травматин і травматинова кислота індукують ділення клітин у місцях пошкоджень, 9(Z)-12-гідроксидодеценева кислота є ефективним стимулятором росту [7]. Продукти гідропероксидліазних реакцій швидше, ніж жасмонова кислота, нагромаджуються при пораненні, створюючи хімічний захисний бар'єр для проникнення інфекції. Передбачається також, що гідропероксидліазні метаболіти можуть діяти як сигнальні молекули в захисних реакціях рослинної клітини [8].

У серії експериментів по дослідженню функціонування 9- й 13-ЛОГ з проростків кукурудзи на фоні сольового стресу аналізували зміни в активності обох ліпоксигеназ відносно активності в контрольних рослинах. Рис. 1 демонструє залежність відносної активності 9- й 13-ЛОГ від часу дії стресового чинника — підвищеної концентрації солі (0,2 моль/л NaCl) на 5-добові проростки кукурудзи. Зниження активності 9-ЛОГ спостерігалося на 4 год дії стресового чинника (залишкова активність 64%) з поступовим поверненням за проміжок

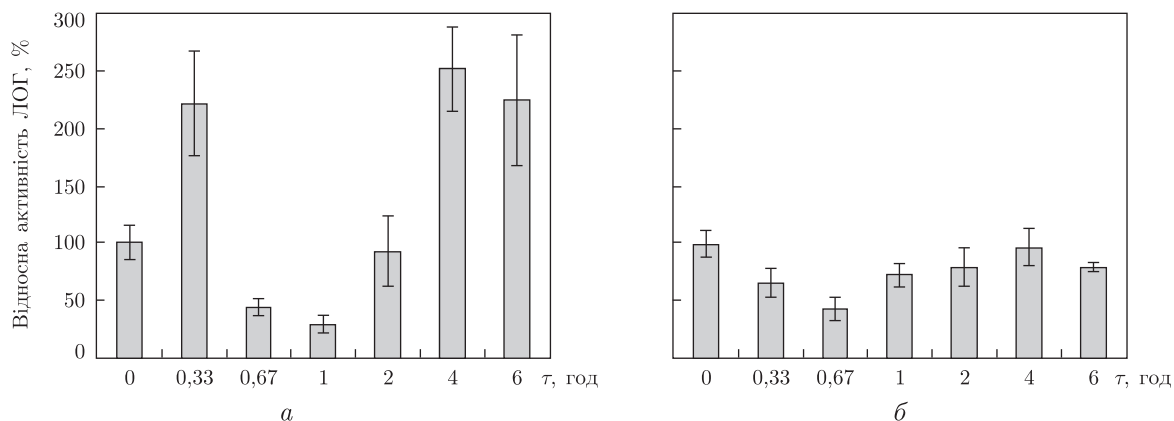


Рис. 2. Залежність активності 9- (а) й 13-ліпоксигенази (б) у меристемі проростків кукурудзи від часу дії 10 мкмоль/л АБК

часу 6–24 год до базального рівня. 13-ЛОГ практично не змінила активність у перші шість годин, а на 8 і 24 год різко падає відповідно на 37 й 58% відносно рівня активності в контрольних рослинах. Отже, сольовий стрес на ранніх етапах (4 год) знизив функціональну активність 9-ЛОГ, практично не змінивши активність 13-ЛОГ, і навпаки, нормалізація активності 9-ЛОГ на 6–24 год супроводжувалася різким зниженням активності 13-ЛОГ на 8–24 год дії сольового чинника.

Таким чином, можна зробити припущення про розділений в часі відгук на стресовий фактор з боку ліпоксигеназ, що синтезують оксиліпіни з певними фізіологічними властивостями. В чому ж полягає причина змін у функціонуванні обох ферментів? Існують свідчення про антагонізм дії АБК та жасмонатів як регуляторів експресії індукованих сольовим стресом білків [9]. З огляду на різке падіння активності ключового ферменту синтезу жасмонової кислоти — 13-ЛОГ, можна припустити, що нагромадження АБК за умов сольового стресу провокує зміни в функціонуванні ферменту. Результати досліджень ліпоксигеназних активностей в меристемі проростків після інкубування їх у присутності 10 мкмоль/л АБК впродовж 0,33–6 год представлено на рис. 2. Активність ферменту в меристемі контрольних рослин було прийнято за 100%. Встановлено значне підвищення активності 9-ЛОГ (більше ніж у два рази) на 0,33 год дії АБК з одночасним різким зниженням активності 13-ЛОГ у цей період. При інкубації проростків з АБК впродовж 0,67–1 год встановлено істотне зниження активності обох ліпоксигеназ. У випадку 9-ЛОГ значне зменшення активності спостерігалось на 1 год дії АБК (майже на 75% контрольного показника активності ферменту). Упродовж 2–6 год дії гормону істотних змін в активності 13-ЛОГ не спостерігалось, а активність 9-ЛОГ на 4 й 6 год у 2–2,5 раза перевищувала вихідну активність ферменту. АБК може як інтенсифікувати, так і інгібувати залежно від часу дії активність 9-ЛОГ, у той самий час у перші хвилини дії АБК відзначено пригнічення активності 13-ЛОГ. Вивчення ефекту АБК на спектр продуктів 9- й 13-ЛОГ, виділених на різних етапах розвитку зародків кукурудзи [10], виявило значне підвищення частки 9-ліпоксигеназних метаболітів та незначну кількість 13-ліпоксигеназних метаболітів. Є дані про підвищення під впливом АБК стійкості рослин [11], але механізми захисної дії цих сполук недостатньо з'ясовані. Відомо також, що в рослинних тканинах у процесі росту та розвитку змінюється активність ліпоксигеназ та їх ізоферментний склад [4, 12, 13]. Іntenсифікація ліпоксигеназного метаболізму може здійснюватися не ли-

ше за рахунок активації присутніх у клітині ферментів, але й завдяки індукції експресії генів.

Таким чином, було зафіксовано підвищення рівня мРНК, які кодують різні форми ліпоксигеназ, під впливом механічного пошкодження рослин [2, 8], осмотичного шоку [5], зміни температури, патогенів, фітогормонів [2, 4, 14]. Стрес або сигнал можуть викликати неоднакову інтенсивність та залежне від часу нагромадження транскриптів різних форм ліпоксигеназ [8, 13]. Механічне пошкодження, патогени, еліситори індують у клітинах рослин вивільнення із мембранних ліпідів ненасичених лінолевої та ліноленової кислот. Подальші перетворення цих кислот ферментами ліпоксигеназної системи призводять до утворення окиснених похідних поліненасичених жирних кислот, в тому числі фізіологічно активних сполук, що виконують роль стимуляторів росту, бактерицидів та фунгіцидів, які індують захисні реакції [7]. Відомо, що продукт ліпоксигеназного метаболізму — 12-гідроксидодецена кислота (12-ГДК) впливає на фосфорилування білків рослин [15] — однієї з універсальних ланок сигнальних систем у регуляції активності багатьох ферментів. Продукти ліпоксигеназного шляху метилжасмонат та 9(Z)-12-гідрокси-9-додецена кислота інтенсивно впливають на рівень фосфорилування білків. Встановлено, що у присутності 12-ГДК спостерігається стимуляція фосфорилування білків у клітинах гороху (*Pisum sativum* L.) [15]. Автори вважають, що фосфорилування білків при дії 12-ГДК може вказувати як на існування протеїнази, що активуються даною сполукою безпосередньо, так і на ініціацію сукупності сигнальних систем клітини (аденілатциклазної, кальцієвої, НАДФ-оксидазної та, можливо, і “власної” ліпоксигеназної).

Отже, сприйняття та передача сигналу АБК у рослинній клітині — процес, в основі якого лежать тонкі молекулярні механізми, в яких задіяні ферменти ліпоксигеназної сигнальної системи, ліпоксигеназні метаболіти — жасмонова кислота, ГДК тощо. При вивченні впливу сольового стресу та АБК на функціонування ліпоксигеназ доведено факт залучення ліпоксигеназної сигнальної системи в АБК-індуковану відповідь клітини. Встановлено також, що різке підвищення активності 9-ЛОГ в перші години дії рослинного гормону АБК супроводжувалося падінням активності 13-ЛОГ — ключового ферменту синтезу жасмонової і травматонової кислот. Ініціація 9-ліпоксигеназного шляху при дії АБК як стресового гормону свідчить не тільки про взаємозв'язок двох сигнальних систем рослинної клітини, а й розширює існуючі на теперішній час уявлення про функціональне значення цієї низки оксиліпінів, роль яких в метаболічних процесах рослинної клітини остаточно нез'ясована.

1. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism // *Phytochemistry*. – 2009. – **70**, No 13./14. – P. 1504–1510.
2. 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. Experiment. Botany*. – 2006. – **57**, No 14. – P. 3767–3779.
3. Pandey G. K., Grant J. J., Cheong Y. H. et al. ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis // *Plant Phys.* – 2005. – **139**, No 3. – P. 1185–1193.
4. Jensen A. B., Poca E., Rigaud M. et al. Molecular characterization of L2 lipoxygenase from maize embryos // *Plant Molec. Biol.* – 1997. – **33**, No 4. – P. 605–614.
5. Maccarrone M., Veldink G. A., Finazzi Agro A., Vliegenthart J. F. G. Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit // *FEBS Lett.* – 1995. – **371**, No 3. – P. 223–226.
6. Kopich V. N., Kretynin S. V., Kharchenko O. V. et al. Effect of 24-epibrassinolide on lipoxygenase activity in maize seedlings under cold stress // *Biopolym. and Cell.* – 2010. – **26**, No 3. – P. 218–224.
7. Гречкин А. Н., Тарчевский И. А. Липоксигеназная сигнальная система // *Физиол. растений*. – 1999. – **46**, № 1. – С. 132–142.

8. Bate N. J., Rothstein S. J. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes // *Plant J.* – 1998. – **16**, No 5. – P. 561–569.
9. Moons A., Prinsen E., Bauw G., Van Montagu M. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots // *Plant Cell.* – 1997. – **9**, No 12. – P. 2243–2259.
10. Abian J., Gelpi E., Pages M. Effect of abscisic acid on the linoleic acid metabolism in developing maize embryos // *Plant Physiol.* – 1991. – **95**. – P. 1277–1283.
11. Busk P. K., Pages M. Regulation of abscisic acid-induced transcription // *Plant molec. biol.* – 1998. – **37**, No 3. – P. 425–435.
12. Saravitz D. M., Siedow J. N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves // *Plant Phys.* – 1996. – **110**, No 1. – P. 287–299.
13. Weichert H., Kolbe A., Kraus A. *et al.* Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings – Lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes // *Planta.* – 2002. – **215**, No 4. – P. 612–619.
14. Creelman R. A., Mullet J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 1997. – **48**. – P. 355–381.
15. Каримова Ф. Г., Тарчевский И. А., Мурсалимова Н. У., Гречкин А. Н. Влияние продукта липоксигеназного метаболизма – 12-гидроксидодеценовой кислоты на фосфорилирование белков растений // *Физиол. растений.* – 1999. – **46**, № 1. – С. 148–152.

*Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 25.06.2011

V. M. Kopich, O. V. Kharchenko

Study of the effect of salt stress and abscisic acid on lipoxygenase activity of maize

Salt stress and abscisic acid (ABA) influences on the maize lipoxygenase (LOX) activity (9- and 13-LOX) are investigated. A variation of the LOX activity under the action of ABA and salt stress is demonstrated. The possible pathways of the involvement of LOX metabolites in the formation of a cell response to salt stress are discussed.