



УДК 577.152.087:581.2

© 2012

Л. М. Бабенко, Л. В. Войтенко, Т. Д. Скатерна,
член-кореспондент НАН України Л. І. Мусатенко

Ідентифікація ліпоксигеназної активності в спорозосних пагонах *Equisetum arvense* L.

Досліджено активність ліпоксигенази в репродуктивних (спорозосних) пагонах Equisetum arvense L. Ідентифіковано наявність двох форм ліпоксигенази — 13-ЛОГ та 9-ЛОГ. Встановлено чітку залежність їх розподілу в різних органах надземної та підземної частин репродуктивного пагона хвоща польового на різних етапах його розвитку.

Ліпоксигенази (лінолеат:кисень:оксидоредуктази КФ 1.13.11.12 (ЛОГ)) — це клас негемових залізовмісних діоксигеназ, які каталізують окиснення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що містять 1,4-цис-, цис-пентадієнову систему, з утворенням гідропероксидів транс-, цис-кон'югованих дієнів [1]. Ця реакція є ключовою у ліпоксигеназному каскаді [2]. Подальші перетворення ферментами ліпоксигеназної системи призводять до утворення окиснених похідних ПНЖК, у тому числі фізіологічно активних сполук — оксиліпінів, які забезпечують відповідь організму на дію абіотичних та біотичних стресів, участь у процесах росту, розвитку, старіння клітин та апоптозі, захисті при патогенному ураженні [3]. Ліпоксигеназна активність була виявлена в широкому спектрі організмів, включаючи тварин, вищі рослини, папоротеподібні, прокаріотичні і еукаріотичні водорості, пекарські дріжджі та інші гриби, ціанобактерії [4–6]. Більша частина ЛОГ є розчинними цитоплазматичними ензимами, але виявлені вони також у хлоропластах, мітохондріях та вакуолі. Завдяки високому вмісту і відносній стабільності деякі ЛОГ у вищих рослин були виділені й очищені до гомогенного стану, а також детально охарактеризовані з точки зору їхньої структури і властивостей [7]. Однак чіткої картини щодо поширеності ЛОГ у нижчих рослин немає.

Мета дослідження полягала у вивченні ліпоксигеназної активності репродуктивних пагонів та кореневища на різних етапах розвитку хвоща польового (*Equisetum arvense* L.).

Матеріали і методи. Хвощ польовий — багаторічна трав'яниста рослина, що має пагони двох типів: репродуктивні (спорозосні) і вегетативні (асимілюючі). Спорозосні пагони — рожево-бурі, нерозгалужені, членисто-кільчасті будови, складаються з 6–7 міжвузлів і коротких вузлів, від яких відходять розміщені кільцями листки, що зростаються між

собою основою, утворюючи потовщені кільцеві піхвові прилистки з 8–10 чорно-бурими зубцями. Спороносні пагони, що з'являються навесні (квітень–початок травня), на верхівках несуть яйцеподібно-циліндричні стробіли зі спорангіями, в яких утворюються спори. Після дозрівання спор репродуктивні пагони відмирають, а замість них розвиваються вегетативні. Кореневище бурувато-чорне, сильно розгалужене містить бульбочки, які утворюються в другій половині літа [8]. Досліджували свіжозібрані спороносні пагони хвоща на різних стадіях його фізіологічного розвитку (закритого та відкритого стробіла), які розділяли на органи — стробіл, 4–6 верхні міжвузля та кільця листків, 1–3 нижні міжвузля та кільця листків, кореневище (нумерацію проводили від кореневища).

Проби ґрунту були відібрані з місць зростання *E. arvense* для характеристики його кислотності-лужного стану. Визначали рН водної та сольової витяжок ґрунту. Для визначення рН водної витяжки 20 г ґрунту, висушеного до повітряно-сухого стану, переносили в колбу і додатково вносили 50 мл дистильованої води. Розчин добре збовтували протягом 1 год і залишали відстоюватись на 24 год до повного осадження ґрунту і освітлення водної витяжки. Величину рН ґрунту вимірювали за допомогою електродів, які обережно занурювали в розчин. Для визначення рН сольової витяжки 20 г ґрунту, висушеного до повітряно-сухого стану, переносили в колбу і додатково вносили 50 мл 1н КСІ. Розчин добре збовтували протягом 1 год і залишали відстоюватись на 24 год до повного осадження ґрунту і освітлення розчину. У колбу обережно, щоб не сколотити розчин, занурювали електроди і вимірювали величину рН. Ступінь кислотності ґрунту визначали, користуючись таблицею [9].

Для одержання ензимного екстракту наважки тканин гомогенізували в охолоджену до 4 °С 0,1 М фосфатному буфері (рН 6,3) з додаванням 2 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ). Після 30-хв екстракції при перемішуванні гомогенат центрифугували на центрифугі ("WPW-310", Польща) при 10000 об/хв протягом 20 хв. Отриманий супернатант використовували для визначення ензиматичної активності. Вміст білка визначали за методом Бредфорд [10]. Кінетичні вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ 46 (Росія). Для побудови рН-залежностей стаціонарних швидкостей реакції ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти використовували такі буферні розчини: рН 4,0–5,5 — 0,1 М Na-ацетатний; рН 6,0–8,0 — 0,1 М Na-фосфатний; рН 8,0–9,5 — 0,1 М боратний. Реакційна суміш для визначення активності 9-ЛОГ, загальним об'ємом 2,5 мл, містила 0,1 М Na-ацетатний буферний розчин (рН 4,2), 100 мкМ лінолеву кислоту, 0,02% луброл РХ, а для визначення активності 13-ЛОГ — 0,1 М Na-фосфатний буферний розчин (рН 7,2), 100 мкМ лінолеву кислоту [11]. Реакцію ініціювали шляхом додавання 20–30 мкл розчину ферменту (концентрація білка 1,4–1,9 мг/мл) і проводили за умов постійної температури (25 ± 0,1) °С. За перебігом реакцій спостерігали, враховуючи збільшення оптичної густини реакційної суміші при $\lambda = 235$ нм, що відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду ліноленової кислоти, молярний коефіцієнт поглинання якої становить $23\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12].

Досліди проводили в двох біологічних та трьох аналітичних повторностях. При побудові кінетичних залежностей використовували середні значення V_{st} , які визначали у трьох вимірюваннях (різниця між величинами становила не більше 5%). Статистичну обробку результатів здійснювали за *t*-тестом Стьюдента, статистично достовірною вважали різницю при $p \leq 0,05$.

Результати і обговорення. Довжина спороносного пагона хвоща становила (23,6 ± ± 1,5) см, а його діаметр коливався в межах 0,2–0,4 см, довжина кільцевого листка (від основи вузла до зазубрини) — (1,2 ± 0,02) см, а усередненого міжвузля — (3,8 ± 0,1) см.

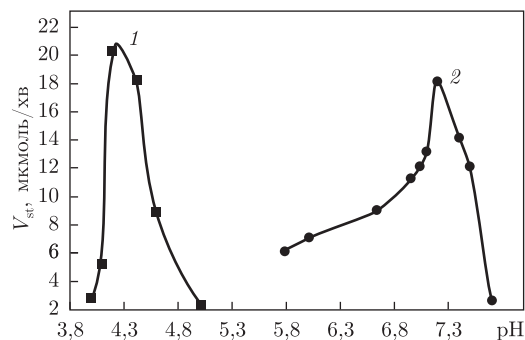


Рис. 1. Залежність стаціонарної швидкості реакції (V_{st}) окиснення лінолевої кислоти 9-ЛОГ (1) та 13-ЛОГ (2) від рН інкубаційного середовища в спороносних пагонах *Equisetum arvense* L.

Безпосередньо перед висипанням спор маса усередненого стробіла становила ($560,0 \pm 8,6$) мг, після висипання — ($542,0 \pm 6,4$) мг, а довжина — ($4,2 \pm 0,3$) см. По закінченні дозрівання спор вологість закритого стробіла становила близько 62%, а відкритого — 48%, що свідчить про завершення спороношення, зневоднення і початок процесів відмирання генеративного пагона. Однак варіабельність морфометричних показників значною мірою залежала від умов навколишнього середовища, зокрема освітлення і вологості [8].

При дослідженні ліпоксигеназної активності в спороносних пагонах *E. arvense* виявлено наявність 13 (цитозольної)- і 9 (мембранозв'язної)-ЛОГ. Для встановлення оптимальних умов функціонування 9-ЛОГ і 13-ЛОГ була визначена залежність стаціонарної швидкості ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти від рН реакційної суміші. При визначенні активності ЛОГ враховували фізико-хімічні умови перебігу реакції окиснення лінолевої кислоти, як практично водонерозчинної сполуки при нейтральних і кислих значеннях рН. Показано, що оптимальним для перебігу реакції 9-ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти є рН 4,2 у присутності детергента луброл РХ (0,02%), а оптимальним для 13-ліпоксигеназного окиснення є рН 7,2 (рис. 1). У літературі нами не знайдено даних стосовно ЛОГ з таким кислим рН-оптимумом. Можливо, це один з механізмів адаптації *E. arvense* до високої кислотності ґрунту (рН 4,8). Відомо, що хвощі є природними індикаторами кислотності ґрунту [8]. Показано, що рН водної витяжки ґрунту, де зростав досліджуваний вид хвоща, становив 4,5, рН сольової — 4,8. Такі значення рН характерні для сильнокислих ґрунтів [9]. Ймовірно, хвощі не тільки є індикаторами ступеня кислотності ґрунту, а й самі сприяють закисленню ґрунтів.

Виявлена певна закономірність розподілу ліпоксигеназної активності (13-ЛОГ та 9-ЛОГ) в органах спороносного пагона хвоща, яка, ймовірно, пов'язана з адаптацією його до умов навколишнього середовища. Активність 13-ЛОГ була визначена в надземній (стробіл, міжвузля, листки) і підземній (кореневище) частинах рослини, тоді як 9-ЛОГ — лише в стробілі і кореневищі.

Аналіз розподілу ліпоксигеназної активності в органах спороносного пагона *E. arvense* виявив певні закономірності. Найвища активність 13-ЛОГ характерна для стробіла, причому на стадії його дозрівання ця активність була втричі більшою, ніж у період висипання спор (табл. 1). Відносно невелика активність 9-ЛОГ спостерігалась у закритих та відкритих стробілах — ($7,3 \pm 0,7$) та ($1,7 \pm 0,1$) мкмоль гідропероксиду лінолевої кислоти/(хв·мкг білка) відповідно і майже втричі більша в кореневищах, як на стадії закритого, так і відкритого стробіла — ($23,3 \pm 1,5$) та ($39,1 \pm 1,1$) мкмоль гідропероксиду лінолевої кислоти/(хв·мкг біл-

Таблиця 1. Активність 13-ЛОГ в спороносних пагонах *Equisetum arvense* L., мкмоль гідропероксиду лінолевої кислоти/(хв · мкг білка)

Стадія розвитку	Орган					
	Стробіл	4-6 верхні міжвузля	4-6 кільця верхніх листків	1-3 нижні міжвузля	1-3 кільця нижніх листків	Кореневище
Закритий стробіл	16,9 ± 1,2	11,0 ± 0,7	8,9 ± 0,5	2,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	9,1 ± 0,4
Відкритий стробіл	5,3 ± 0,4	3,5 ± 0,3	1,9 ± 0,01	0,8 ± 0,001	0,6 ± 0,002	2,7 ± 0,1

ка) відповідно. Причому активність цієї ЛОГ значно зростала в кореневищі при висипанні спор — на початку процесу відмирання генеративного пагона. Ймовірно, висока активність 13-ЛОГ у закритих стробілах обумовлена активними метаболічними процесами, пов'язаними з дозріванням спор. Відомо, що 13-ЛОГ не характерна для кореневої системи вищих рослин, бо є хлоропластасоційованою [7]. Можливо, це і пояснює її низький вміст у кореневищах спороносного пагона хвоща.

Як відомо, основними продуктами ліпоксигеназних реакцій є моногідроперокси, що мають різні фізіологічні функції. 9-ЛОГ каталізує реакцію утворення 9-гідропероксидів, а 13-ЛОГ — 13-гідропероксидів ПНЖК [2]. 13-гідроперокси є попередниками біологічно активних речовин, таких як травматин, жасмонова кислота та її похідні (метилжасмонат, 7-ізожасмонат, жасмоїлглюкозиди). Біосинтез жасмонової кислоти розпочинається з окисненням лінолевої кислоти до 13-гідропероксиду лінолевої кислоти. Процес синтезу розпочинається в хлоропластах і закінчується в пероксисомах. Фермент локалізований у цитозолі хлоропластів.

Жасмонати діяли як стимулятори чи інгібітори в різних біологічних системах. Вони інгібували ріст пагонів і коренів у концентрації — 10^{-3} М, проростання пилюку, ріст калусу та стимулювали синтез алкалоїдів, утворення коренів із меристем бульб картоплі. При дослідженні локалізації жасмонатів у різних органах *Vicia faba* встановлено значне їх нагромадження в надземних органах — квітках, молодих листках, плодах (10–30 мкг/г маси сирої речовини) і слідові кількості в коренях, зрілих чи старих листках [13]. Як жасмонова кислота, так і її похідні контролюють гормоноподібну регуляцію росту та розвитку, забезпечують адаптацію рослин до стресів, шляхом як безпосереднього впливу на активність певних ферментів, так і опосередкованим ефектом, що реалізується в індукції експресії генів [14].

9-гідроперокси є попередниками сполук, що відіграють важливу роль у бульбоутворенні картоплі. В умовах *in vivo* вони індукували бульбоутворення, викликаючи переорієнтацію мікротрубочок, що призводило до збільшення радіального розтягування клітин і сприяло розвитку бульб [15]. Ймовірно, високий вміст 9-ЛОГ в кореневищах хвоща, як і в коренях вищих рослин (пасльонові), відіграє ключову роль в утворенні крохмалевмісних бульбочок, що формуються на них у кінці періоду вегетації репродуктивного пагона.

Таким чином, у *E. arvense* вперше ідентифіковано наявність двох форм ліпоксигенази — 13-ЛОГ та 9-ЛОГ. Встановлено чітку залежність їх розподілу в різних органах надземної та підземної частин репродуктивного пагона хвоща на різних етапах його розвитку.

1. Rokach J. Leukotrienes and Lipoxygenases. Chemical, biological and clinical aspects. – New York: Elsevier, 1989. – 518 p.
2. Feussner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway // Annu. Rev. Plant Biol. – 2002. – 53. – P. 275–297.

3. Nemchenko A., Kunze S., Feussner I., Kolomiets M. Duplicate maize C-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments II // J. Exp. Bot. – 2006. – **57**, No 14. – P. 767–779.
4. Radmark O., Samuelsen B. 5-lipoxygenase: mechanism of regulation // J. lipid research. – 2009. – Supl. – P. 40–45.
5. Zimmennan D. C., Vick B. A. Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa* // Lipids. – 1983. – **190**. – P. 264–266.
6. Hamberg M. Isolation and structure of lipoxygenase from *Saprolegnia parasitica* // Biochem. Biophys. Acta. – 1986. – **876**. – P. 688–692.
7. Schechter G., Grossman S. Lipoxygenase baker's yeast: purification and properties // Int. J. Biochem. – 1983. – **15**. – P. 1295–1304.
8. Флора Беларуси. Сосудистые растения // Под ред. В. Парфенова. – Минск: Беларуская навука, 2009. – Т. 1. – 197 с.
9. Гордій М. М., Лісовел А. П., Бижін А. В. Агрохімічний аналіз. – Київ: Арістей, 2005. – 467 с.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, No 2. – P. 248–254.
11. Schilstra M., Veldink G., Vliegenthart J. Effect of nonionic detergents on lipoxygenase catalysis // Lipids. – 1994. – **29**, No 4. – P. 225–231.
12. Gibian M. J., Vandenberg P. Product yield in 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.
13. Sembdner G., Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates // Annu. Rev. Plant Physiol. – 1993. – **44**. – P. 569–589.
14. Панюта О. О., Шаблій В. А., Белава В. Н. Жасмонова кислота та її участь у захисних реакціях рослинного організму // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 2. – С. 14–26.
15. Лемеза О., Зубо Я., Кузнецов В. Регуляція експресії генів ліпоксигенази в міні-клубнях картофеля под действием фитогормонов // Физиология растений. – 2010. – **57**, № 5. – С. 765–770.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного

НАН України, Київ

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії

НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.05.2012

Л. М. Бабенко, Л. В. Войтенко, Т. Д. Скатерная,
член-корреспондент НАН України **Л. И. Мусатенко**

Идентификация липоксигеназной активности в спороносных побегах *Equisetum arvense* L.

*Исследована активність ліпоксигенази в репродуктивних (спороносних) побегах *Equisetum arvense* L. Идентифицировано наличие двух форм липоксигеназы — 13-ЛОГ и 9-ЛОГ. Установлена четкая зависимость их распределения в различных органах надземной и подземной части репродуктивного побега хвоща полевого на различных этапах его развития.*

L. M. Babenko, L. V. Voytenko, T. D. Skaterna,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **L. I. Musatenko**

Identificatio of lipoxygenase activity in reproductive (sporogenous) shoots of *Equisetum arvense* L.

*The lipoxygenase activity in reproductive (sporogenous) shoot of *Equisetum arvense* is investigated. The presence of two forms of lipoxygenase, 13-LOX and 9-LOX, is identified. The strict dependence of their distribution in the different organs of the above-ground and underground parts of reproductive plant of horse-tail on the different stages of its development is established.*