

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.08.098>

УДК 631.527:633.11

Л.М. Бабенко, И.В. Косаковская

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

Влияние моделированной почвенной засухи на липоксигеназную активность *Triticum spelta*

Представлено членом-корреспондентом НАН Украины П.М. Царенко

*Исследовано влияние моделированной почвенной засухи на липоксигеназную (ЛОГ) активность растений *Triticum spelta*. В надземной части растений идентифицированы три мембраносвязанные молекулярные формы 9-ЛОГ: ЛОГ-1 (pH_{opt} 5,5), ЛОГ-2 (pH_{opt} 5,8) и ЛОГ-3 (pH_{opt} 6,2), в корнях — одна 9-ЛОГ (pH_{opt} 6,0). Показано, что в условиях засухи активность ЛОГ-2 и ЛОГ-3 из надземной части возрастала на 120 и 190 % соответственно, тогда как увеличение активности ЛОГ-1 было менее выраженным. Наибольшее возрастание активности зафиксировано для 9-ЛОГ, локализованной в корневой системе растений. Полученные результаты косвенно указывают на причастность ЛОГ к формированию реакции-ответа у растений *T. spelta* в условиях почвенной засухи. Обсуждается дифференцированное участие молекулярных форм ЛОГ в адаптации растений *T. spelta* к условиям водного дефицита.*

Ключевые слова: *Triticum spelta* L., липоксигеназа, засуха.

Значительная площадь мировых посевов злаковых культур находится в зоне недостаточного или неустойчивого увлажнения. Засуха — один из наиболее суровых, непредсказуемых абиотических стрессоров, ограничивающих зерновую продуктивность пшениц [1, 2]. В последние десятилетия сформировались представления, согласно которым повреждения растений вследствие действия стресса начинаются с нарушений структуры и функций мембран [1, 3]. Стабильность мембран растений зависит от качественных и количественных изменений липидных молекул, прежде всего фосфолипидов и жирных кислот. Увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот в составе мембран способствует повышению устойчивости растений при воздействии различных стрессоров [3]. Интенсификация процессов окисления мембранных липидов, в том числе пероксидное окисление липидов (ПОЛ), относится к универсальным сигнальным механизмам, запускающим адаптивные программы при стрессах. ПОЛ инициируется α -диоксигеназами и липоксигеназами (ЛОГ) [4]. Липоксигеназный каскад является источником физиологически активных соединений — оксилипинов [4, 5]. Липоксигеназа (линолеат: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.13.11.12)

© Л.М. Бабенко, И.В. Косаковская, 2018

катализирует присоединение молекулярного кислорода в местах двойных связей углеродной цепи полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), отличаясь позиционной специфичностью окисления С-9 (9-ЛОГ) либо С-13 (13-ЛОГ) [4]. Изоформы ЛОГ инициируют несколько направлений катаболизма ПНЖК с образованием промежуточных оксигенированных производных [5, 6], участвующих в регуляции роста и развития, формировании реакций на сигналы внешней среды, обеспечивающих связь между царствами живых организмов [4, 5, 7]. Существование изоформ липоксигеназы с различной субклеточной локализацией предполагает полифункциональность энзима и вовлечение его в различные процессы [5]. Среди продуктов метаболизма ЛОГ присутствуют фитогормоны травматиновая и жасмоновая (ЖК) кислоты [5, 7]. ЛОГ-каскад является одним из важнейших сигнальных путей растений, известным как ЖК-зависимая сигнальная система [4, 7]. Субстратами ЛОГ выступают свободные, а также находящиеся в составе запасных триацилглицеринов, гликолипидов и фосфолипидов клеточных мембран ПНЖК [6].

Результаты, полученные при исследовании влияния засухи на активность липоксигеназ растений, немногочисленны. Показано, что при водном дефиците изоформы ЛОГ вызвали окислительную модификацию мембранных липидов сои, увеличивая содержание гидропероксидов в этерифицированных жирных кислотах липидного бислоя и количество транскриптов энзима [8].

Исследование протеома листьев пшеницы в условиях засухи выявило увеличение ЛОГ-активности и синтез жасмонат-индуцированных белков [9]. Сообщалось о дифференцированном участии трех молекулярных форм ЛОГ в адаптации растений пшеницы к засухе, а также о том, что одним из факторов, связанным с сохранением продуктивности в условиях недостатка влаги, может быть активность изоферментов ЛОГ [10]. Изоформы ЛОГ идентифицированы у представителей семейства *Poaceae*, однако вопрос об их физиологической роли на сегодня остается открытым [5, 9, 10].

Пшеница является одной из главных зерновых культур, составляющих основу рациона во многих странах мира. В современном производстве пшеницы четко обозначились тенденции, направленные на возрождение, селекцию и внедрение в производство забытых региональных зерновых культур, так называемых античных злаков. Одним из таких злаков является *Triticum spelta*. Благодаря ценным пищевым и хозяйственным свойствам, отсутствующим у мягкой пшеницы, эта культура сегодня переживает второе рождение [11]. В формировании стратегии адаптации к неблагоприятным внешним воздействиям задействовано множество генов. Однако запуск первичных стрессовых реакций осуществляется с участием общих для различных видов растений сигнальных путей [12]. Принимая во внимание, что ЛОГ как сигнальная молекула участвует в формировании реакций-ответов на стресс, целью нашего исследования было изучение влияния моделированной почвенной засухи на ЛОГ активность в органах *T. spelta*.

Материалы и методы. *Растительный материал и условия выращивания.* Опыты проводили с 14-суточными растениями *T. spelta* ($2n = 42$) сорта Франкенкорн, созданного в 90-х годах XX века на основе старых сортов спельты путем обратного скрещивания. Сорт среднерослый, устойчив к полеганию, чрезмерному увлажнению, морозоустойчивый, экологически пластичный, считается генетически самым чистым сортом *T. spelta*. Семена получены из коллекции Национального центра генетических ресурсов растений Украины

(г. Харьков). Промытые в дистиллированной воде семена переносили в чашки Петри на увлажненную раствором Кнопа фильтровальную бумагу и помещали на сутки в термостат, где они находились в темноте, при температуре 24 °С. Проклюнувшиеся семена высаживали в сосуды емкостью 2 л. В качестве субстрата использовали прожаренный речной песок. Сосуды помещали в камеру искусственного климата, где растения культивировали в течение 14 сут при температуре воздуха 25/18 °С (день/ночь), относительной влажности 60–70 %, освещении 180 мкмоль/(м²·с), фотопериод составлял 16/8 ч (день/ночь). Полив проводили ежедневно раствором Кнопа. Почвенную засуху создавали, прекращая полив 14-суточных растений на четыре дня до увядания листьев и снижения влагоемкости субстрата в два раза.

Определение энзиматической активности. Для выделения препарата ЛОГ навески растительного материала гомогенизировали в охлажденном до 4 °С 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,3), содержащем 2 мМ фенилметилсульфоилфторид (ФМСФ), 0,04 % метабисульфит натрия (масса/объем). Гомогенат центрифугировали в течение 30 мин при 4000 x g, при температуре 4 °С. Полученный супернатант использовали для определения активности ЛОГ. Для построения кривых рН-зависимости стационарных скоростей реакции липоксигеназного окисления линолевой кислоты использовали 0,1 М натрий-ацетатный (рН 4,0–5,5), 0,1 М натрий-фосфатный (рН 6–8) и 0,1 М боратный (рН 8,0–9,5) буферные растворы. Концентрация линолевой кислоты в реакционной смеси общим объемом 2,5 мл составила 100 мкМ в присутствии 0,02 % луброла РХ (масса/объем). Активность ЛОГ определяли на спектрофотометре Specord M-40. Реакция инициировалась добавлением 50–100 мкл энзима (концентрация составляла 0,5–1,5 мг/мл) и проводилась при постоянной температуре 25 ± 0,1 °С. За ходом реакции наблюдали, учитывая увеличение оптической плотности реакционной смеси при $\lambda = 235$ нм, соответствующей максимальному поглощению сопряженного диенового хромофора в молекуле гидропероксида линоленовой кислоты, молярный коэффициент экстинкции которого составляет 23000 М⁻¹ · см⁻¹. Опыты проводили в двух биологических и трех аналитических повторах. В каждую биологическую повторность отбирали по 40 растений. При построении кинетических зависимостей использовали средние значения V_{st} , которые определяли в трех измерениях (разница между величинами составляла не более 5 %). Статистическую обработку результатов проводили по t-тесту Стьюдента, статистически достоверной считали разницу при $p \leq 0,05$. На графиках и диаграммах представлены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. В надземной части 14-суточных растений *T. spelta* выявлены три молекулярные формы мембранносвязанной 9-ЛОГ: ЛОГ-1 (рН_{опт} 5,5), ЛОГ-2 (рН_{опт} 5,8) и ЛОГ-3 (рН_{опт} 6,2). Одна мембранносвязанная изоформа 9-ЛОГ (рН_{опт} 6,0) идентифицирована в корнях (рис. 1). В контрольных условиях активность молекулярных форм ЛОГ в надземной части растений была существенно выше, чем в корнях. Наивысший показатель активности зафиксирован у ЛОГ-2.

В условиях засухи активность ЛОГ-2 и ЛОГ-3 из надземной части возросла на 120 и 190 % соответственно. Увеличение активности ЛОГ-1 было менее выраженным. Наиболее значительное (почти в четыре раза) увеличение активности зафиксировано у 9-ЛОГ, локализованной в корневой системе растений (рис. 2).

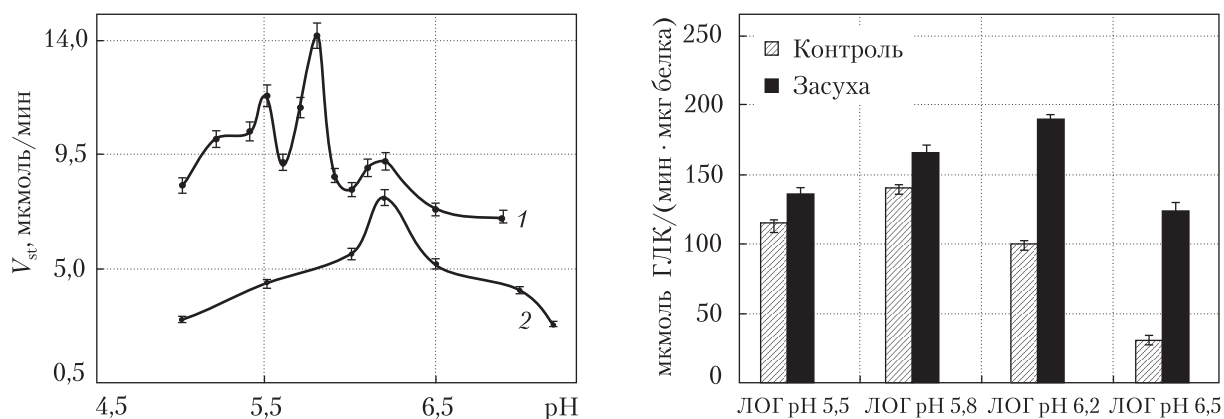


Рис. 1. Зависимость стационарной скорости реакции (V_{st}) окисления линолевой кислоты от pH инкубационной среды в надземной части (1) и корнях (2) 14-суточных растений *T. spelta*

Рис. 2. Активность молекулярных форм 9-ЛОГ в надземной части и корнях *T. spelta* в контроле и после почвенной засухи. ГЛК — гидропероксид линолевой кислоты

Наблюдавшееся после моделированной почвенной засухи повышение активности ЛОГ-2 и ЛОГ-3 соответствовало достаточно высоким показателям в содержании зеленых пигментов [13]. Тогда как значительное увеличение активности мембраносвязанной 9-ЛОГ в корнях коррелировало с установленными нами ранее изменениями ростовых процессов. Так, моделированная почвенная засуха, вызванная прекращением полива в течение четырех дней, замедляла рост растений *T. spelta*. При этом более чувствительной к недостатку влаги оказалась корневая система, длина которой уменьшалась на 19 %, а масса — на 48 %, тогда как изменения в надземной части были менее выраженными [13]. Изучение влияния температурных стрессов на липоксигеназную активность растений *T. spelta* выявило, что активность ЛОГ-1 и ЛОГ-2 в надземной части и 9-ЛОГ в корнях значительно увеличивалась после кратковременной гипертермии, тогда как реакция на холодовое воздействие была слабее [14]. Изменения в липоксигеназной активности коррелировали с ультраструктурными перестройками. В строме хлоропластов клеток мезофилла листьев спелты в условиях водного дефицита наблюдалось значительное накопление пластоглобул, деструкция тилакоидных мембран, частичная волнообразная упаковка тилакоидов гран, значительное расширение люменальных промежутков, нарушение структурной связи между тилакоидами гран и стромы, формирование многочисленных липидных капель в цитоплазме (неопубликованные данные). В работах других авторов сообщалось, что водный дефицит вызывал повышение активности мембраносвязанной ЛОГ и приводил к уменьшению активности растворимых форм энзима [15]. При водном дефиците изменения в активности ЛОГ коррелировали с изменениями массы побега, содержания хлорофиллов и каротиноидов, скоростью транспорта электронов [15]. Показано, что цитозольные изоформы ЛОГ причастны к синтезу жасмонатов и других оксипиринов, участвующих в защитных реакциях при водном дефиците [7]. Изменение липоксигеназной активности, происходящее при стрессе, указывает на существование тонких механизмов ее регуляции.

Активность ЛОГ рассматривается как биологический маркер физиологического состояния растения [5, 10, 15]. Зафиксированные в наших исследованиях изменения актив-

ности ЛОГ в органах растений *T. spelta* в условиях моделированной почвенной засухи указывают на дифференцированное вовлечение изоформ энзима в адаптацию к водному дефициту.

*Работа выполнена в рамках проекта, финансируемого Национальной академией наук Украины, № III-82-17.454 “Фитогормональная система новых генотипов *Triticum aestivum* L. и её диких предков при действии экстремальных климатических факторов” (2017–2021 pp.).*

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Anjum S.A., Xie X., Wang L., Saleem M.F., Man C., Lei W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agr. Res.* 2011. **6**, № 9. P. 2026–2032.
2. Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 2009. **29**. P. 185–212.
3. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. 2012. **235**. P. 1091–1105.
4. Savchenko T.V., Zastrijnaja O.M., Klimov V.V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014. **79**, № 4. P. 362–375.
5. Babenko L.M., Shcherbatiuk M.M., Skaterna T.D., Kosakivska I.V. Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *Ukr. Biochem. J.* 2017. **89**, № 1. P. 5–21.
6. Andreou A., Feussner I. Lipoxygenases – structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*. 2009. **70**, № 13–14. P. 1504–1510.
7. Wasternack C., Song S. Jasmonates: an update on biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* 2017. **68**, № 6. P. 1303–1321.
8. Maccarrone M., Veldink G.A., Aghrò A.F., Vliegthart J.F.G. Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit. *FEBS Lett.* 1995. **371**, № 3. P. 223–226.
9. Zhang H., Zhang L., Lv H., Yu Z., Zhang D., Zhu W. Identification of changes in *Triticum aestivum* L. leaf proteome in response to drought stress by 2D-PAGE and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Acta Physiol Plant.* 2014. **36**. P. 1385–1398.
10. Permyakova M.D., Permyakov A.V., Osipova S.V., Pshenichnikova T.A. Lipoxygenase from the leaves of wheat grown under different water supply conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. **48**, № 1. P. 77–82.
11. Liubych V.V., Hospodarenko H.M., Poltoretskyi S.P. Quality features of spelt wheat grain. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publ., 2017. 108 p.
12. Karabudak T., Bor M., Özdemir F., Türkan İ. Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase 7 and lipoxygenase gene expression. *Mol. Biol. Rep.* 2014. **41**. P. 1401–1410.
13. Kosakivska I.V., Vasyuk V.A., Babenko L.M., Voytenko L.V. Drought stress effects on *Triticum spelta* L. structural and functional characteristics. *J. Stress Physiol. Biochem.* 2018. **14**, № 1. P. 12–18.
14. Бабенко Л.М. Влияние стрессовых температур на активность липоксигеназ у *Triticum spelta*. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біол. 2018. **1**, № 43. С. 40–46.
15. Permyakova M.D., Permyakov A.V., Osipova S.V., Pshenichnikova T.A., Shishparenok A.A., Rudikovskaya E.G., Rudikovskiy A.V., Verkhoturov V.V., Börner A. Chromosome regions associated with the activity of lipoxygenase in the genome D of *Triticum aestivum* L. under water deficit. *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. **64**, № 1. P. 28–40.

Поступило в редакцию 22.05.2018

REFERENCES

1. Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C. & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agr. Res.*, 6, No. 9. pp. 2026-2032.
2. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. & Basra S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.*, 29, pp. 185-212.

3. Theocharis, A., Clement, C., & Barka, E. A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235, pp. 1091-1105.
4. Savchenko, T. V., Zastrijnaja, O. M. & Klimov, V. V. (2014). Oxylipins and plant abiotic stress resistance. *Biochemistry (Mosc.)*, 79, No. 4, pp. 362-375.
5. Babenko, L. M., Shcherbatiuk, M. M., Skaterna, T. D. & Kosakivska, I. V. (2017). Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *Ukr. Biochem. J.*, 89, No. 1, pp. 5-21.
6. Andreou, A. & Feussner, I. (2009). Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*, 70, No. 13-14, pp. 1504-1510.
7. Wasternack, C. & Song, S. (2017). Jasmonates: an update on biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.*, 68, No. 6, pp.1303-1321.
8. Maccarrone, M., Veldink, G. A., Agrò, A. F. & Vliegenthart, J. F. G. (1995). Modulation of soybean lipoxygenase expression and membrane oxidation by water deficit. *FEBS Lett.*, 371, No. 3, pp. 223-226.
9. Zhang, H., Zhang, L., Lv, H., Yu, Z., Zhang, D. & Zhu, W. (2014). Identification of changes in *Triticum aestivum* L. leaf proteome in response to drought stress by 2D-PAGE and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Acta Physiol. Plant.*, 36, pp.1385-1398.
10. Permyakova, M. D., Permyakov, A. V., Osipova, S. V. & Pshenichnikova, T. A. (2012). Lipoxygenase from the leaves of wheat grown under different water supply conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 48, No. 1, pp. 77-82.
11. Liubych, V. V., Hospodarenko, H. M. & Poltoretskyi, S. P. (2017). Quality features of spelt wheat grain. Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publ.
12. Karabudak, T., Bor, M., Özdemir, F. & Türkan, İ. (2014). Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase 7 and lipoxygenase gene expression. *Mol. Biol. Rep.*, 41, pp.1401-1410.
13. Kosakivska, I. V., Vasyuk, V. A., Babenko, L. M. & Voytenko, L. V. (2018). Drought stress effects on *Triticum spelta* L. structural and functional characteristics. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 14, No. 1, pp.12-18.
14. Babenko, L. M. (2018). The effect of stress temperatures on the activity of lipoxygenases in *Triticum spelta*. *Bull. Kharkiv Nat. Agrar. Univ. Ser. Biol.*, 1, No. 43, pp.40-46.
15. Permyakova, M. D., Permyakov, A. V., Osipova, S. V., Pshenichnikova, T. A., Shishparenok, A. A., Rudikovskaya, E. G., Rudikovskiy, A. V., Verkhotur, V. V. & Börner, A. (2017). Chromosome regions associated with the activity of lipoxygenase in the genome D of *Triticum aestivum* L. under water deficit. *Russ. J. Plant Physiol.*, 64, No. 1, pp 28-40.

Received 22.05.2018

Л.М. Бабенко, І.В. Косаківська

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ
E-mail: lilia.babenko@gmail.com

ВПЛИВ МОДЕЛЬОВАНОЇ ҐРУНТОВОЇ ПОСУХИ НА ЛІПОКСИГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ *TRITICUM SPELTA*

Досліджено вплив модельованої ґрунтової посухи на ліпоксигеназну (ЛОГ) активність рослин *Triticum spelta*. У надземній частині рослин ідентифіковані три мембранозв'язані молекулярні форми 9-ЛОГ: ЛОГ-1 ($pH_{\text{онт}}$ 5,5), ЛОГ-2 ($pH_{\text{онт}}$ 5,8) і ЛОГ-3 ($pH_{\text{онт}}$ 6,2), в коренях — одна 9-ЛОГ ($pH_{\text{онт}}$ 6,0). Показано, що в умовах посухи активність ЛОГ-2 і ЛОГ-3 з надземної частини зростала на 120 і 190 % відповідно, тоді як збільшення активності ЛОГ-1 було менш вираженим. Найбільше зростання активності зафіксовано для 9-ЛОГ, що локалізована в кореневій системі рослин. Отримані результати вказують на причетність ЛОГ до формування реакції-відповіді у рослин *T. spelta* в умовах ґрунтової посухи. Обговорюється диференційована участь молекулярних форм ЛОГ в адаптації рослин *T. spelta* до умов водного дефіциту.

Ключові слова: *Triticum spelta* L., ліпоксигенази, посуха.

L.M. Babenko, I.V. Kosakivska

M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: lilia.babenko@gmail.com

EFFECT OF MODELED SOIL DROUGHT
ON LIPOXYGENASE ACTIVITY IN *TRITICUM SPELTA*

The effect of a simulated moderate soil drought on the lipoxygenase (LOG) activity of *Triticum spelta* plants is studied. Three membrane-bound molecular forms of 9-LOG: LOG-1 ($\text{pH}_{\text{opt}} 5.5$), LOG-2 ($\text{pH}_{\text{opt}} 5.8$), and LOG-3 ($\text{pH}_{\text{opt}} 6.2$) are identified in the above-ground part, in the roots — one 9-LOG ($\text{pH}_{\text{opt}} 6.0$). It is shown that, under conditions of drought, the activity of LOG-2 and LOG-3 from the above-ground part increased by 120 and 190 %, respectively, whereas an increase in the activity of LOG-1 is less pronounced. The highest increase in the activity is recorded for 9-LOG localized in the root system of plants. The results obtained indirectly indicate that LOG is involved in the formation of a reaction-response in *T. spelta* plants under soil drought conditions. Differentiated involvement of the molecular forms of LOG in the adaptation of *T. spelta* plants to the conditions of water deficiency is discussed.

Keywords: *Triticum spelta* L., lipoxygenase, drought.