

## Вплив 24-епібрасиноліду на ліпоксигеназну активність у проростках кукурудзи за дії низькотемпературного стресу

В. М. Копіч, С. В. Кретинін, О. В. Харченко, Р. П. Літвіновська<sup>1</sup>,  
Н. М. Чащина<sup>1</sup>, В. О. Хріпач<sup>1</sup>

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України  
Вул. Мурманська, 1, Київ, Україна, 02094

<sup>1</sup>Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі  
Вул. Купревича, 5/2, Мінськ, Білорусь, 220141

kopich@bpci.kiev.ua

**Мета.** Дослідження впливу 24-епібрасиноліду на активність 9- і 13-ліпоксигеназ (9- і 13-ЛОГ) з проростків кукурудзи за нормальних умов (25 °С) та за дії низькотемпературного стресу (5 °С). **Методи.** Активність ЛОГ визначали за умов обробки проростків 0,01 і 1 мкМ 24-епібрасинолідом. Ферменти екстрагували з проростків кукурудзи в 0,1 М натрій-ацетатному буфері (рН 4,5) за присутності неіонного детергенту (0,1 % Brij-99) та ЕДТА (0,1 мМ). Активність 9- і 13-ЛОГ визначали спектрофотометрично при 234 нм з використанням лінолевої кислоти як субстрату при рН 6,0 і 7,0 за присутності та відсутності 0,02 % Lubrol PX відповідно. **Результати.** Показано, що за нормальних умов в оброблених 24-епібрасинолідом проростках активність ЛОГ зростає у 3–6 разів. За дії низькотемпературного стресу за присутності 1 мкМ 24-епібрасиноліду активність 9- і 13-ЛОГ підвищувалася в 4 та 10 разів відповідно. **Висновки.** Одержані в роботі результати розширюють існуючі на сьогодні уявлення щодо можливого шляху залучення метаболітів ЛОГ до формування клітинної відповіді на дію брасиностероїдів.

**Ключові слова:** лінолева кислота, ліпоксигеназа, 24-епібрасинолід, активація, низькотемпературний стрес.

**Вступ.** Ліпоксигенази (КФ 1.13.11.12, ЛОГ) – ферменти, які каталізують окиснення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що містять 1,4-цис, цис-пентадієнову систему, з утворенням гідропероксидів транс-, цис-кон'югованих дієнів [1]. Подальші перетворення ферментами ліпоксигеназної системи призводять до утворення окиснених похідних ПНЖК, у тому числі фізіологічно активних сполук – сигнальних молекул, наприклад, жасмонової

кислоти, бактерицидів і фунгіцидів [2, 3]. За дії стресових чинників *in vivo* показано індукцію активності та зміну рівня транскриптів генів ЛОГ [4–7]. Експресія генів ферментів ЛОГ-шляху перетворення ПНЖК модулюється також сигнальними молекулами (жасмонова, саліцилова та абсцизова кислоти) [5, 8–12]. Участь ЛОГ-сигнальної системи в індукованій брасиностероїдами (БС) відповіді рослинної клітини продемонстровано в роботі [13], проте безпосередній вплив БС на активність ферментів ЛОГ-шляху метаболізму ПНЖК не дослід-

жено. Наразі існують повідомлення, що як БС, так і жасмонова кислота стимулюють експресію стрес-залежних генів (*OPR3*, *LOX2*) [14–16], що вказує на можливість існування зв'язку між дією БС та рівнем ліпоксигеназних метаболітів.

Мета даної роботи полягала у вивченні впливу 24-епібрасиноліду на модуляцію активності 9- і 13-ЛОГ кукурудзи в процесі формування відповіді рослинної клітини на дію низьких температур.

**Матеріали і методи.** Використано такі реактиви та матеріали: лінолева кислота, арахідонова кислота, неіонний детергент Lubrol PX, аніонний детергент Brij-99 («Fluka», Швейцарія); етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) («Reanal», Угорщина). Решта реактивів виробництва країн СНД мали кваліфікацію «х. ч.» або «ос. ч.». Препарат 24-епібрасиноліду синтезовано в лабораторії хімії стероїдів Інституту біоорганічної хімії НАН Білорусі. Біологічний об'єкт – п'ятиденні проростки кукурудзи (гібрид Говерла МВ).

Зерна кукурудзи пророщували протягом 5 діб в термостаті (25 °С) у темряві за присутності або відсутності 0,01 і 1 мкМ 24-епібрасиноліду. Частину п'ятиденних проростків витримували впродовж 24 год при  $t = 5$  °С (умови низькотемпературного стресу), а іншу частину рослин залишали на цей час при  $t = 25$  °С (контрольні проростки), після чого з них скальпелем ізолювали мезокотиль.

ЛОГ виділяли з тканини мезокотилію [17], яку гомогенізували у п'яти об'ємах 0,1 М натрій-ацетатного буфера (рН 4,5), що містить 0,1% Brij-99, 0,1 мМ ЕДТА і 2 мМ метабісульфіт натрію. Після 30-хв екстракції при перемішуванні гомогенат центрифугували (45 хв, 5000 об/хв) на центрифугі РС-6 (РФ). Усі процедури виконували за  $t = 4$  °С. Одержаний супернатант використовували для виявлення активності ЛОГ. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [18].

Реакційна суміш для визначення активності 9-ЛОГ у супернатанті містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,0), 0,02 % Lubrol PX, 0,1 мМ лінолеву кислоту, а для визначення активності 13-ЛОГ – 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,0) і 0,02 мМ лінолеву кислоту [5, 17, 19]. Реакцію ініціювали внесенням у реакційну суміш 1–2 мкг ферменту, активність якого визнача-

ли на спектрофотометрі Specord M-40 («Carl Zeiss, Jena», Німеччина) за зміною оптичної густини реакційної суміші з часом при  $\lambda = 235$  нм. Результати визначення активності ЛОГ представляли в оптичних одиницях ( $\lambda = 235$  нм), що відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду лінолевої кислоти (молярний коефіцієнт екстинкції дорівнює  $23000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [20]) за 1 хв на 1 мл розчину білка та в оптичних одиницях за 1 хв на 1 мг білка. Вимірювання здійснювали в термостатованій комірці за температури 25 °С у триразовій повторності. Для побудови рН-залежностей стаціонарних швидкостей реакцій окиснення лінолевої кислоти, що каталізуються 9- та 13-ЛОГ, використовували буферні розчини: 0,1 М натрій-ацетатний (рН 4–5); 0,1 М МЕС- $\text{NaOH}$  (рН 5–6,5); 0,1 М натрій-фосфатний (рН 6–8); 0,1 М натрій-боратний (рН 8–9).

Статистичний аналіз даних включав визначення  $M \pm m$ , де  $M$  – середня величина;  $m$  – її стандартна похибка; кількість біологічних повторів  $n = 3$ –6. Для порівняння показників досліджуваних груп використовували  $U$ -критерій Мана-Вітні (Mann-Whitney  $U$ -test). Значення  $p < 0,05$  розглядали як критерій значущості різниці.

**Результати і обговорення.** Для серії експериментів з дослідження впливу 24-епібрасиноліду на функціонування ЛОГ з проростків кукурудзи підібрано оптимальні умови визначення активності 9- і 13-ЛОГ. 9-ЛОГ з проростків кукурудзи каталізує реакцію утворення 9-гідропероксидів, а 13-ЛОГ – 13-гідропероксидів ПНЖК [17].

При визначенні активності ЛОГ враховували фізико-хімічні умови протікання реакції окиснення лінолевої кислоти як практично водонерозчинної сполуки за нейтральних і кислих рН. Ферментативна активність різних ЛОГ суттєво залежить від агрегатного стану субстрату реакції, рН реакційної суміші, наявності природних і синтетичних амфіфільних сполук, таких як фосфоліпіди та детергенти [5, 17, 21–25]. Оптимальні значення рН дії різних ЛОГ варіюють від 5,5 до 9,5. У такому широкому діапазоні рН неминучими є зміни ступеня іонізації і відповідно агрегатного стану ПНЖК від емульсії до істинного розчину [26]. Наші попередні дослідження свідчать, що ЛОГ належать до двох

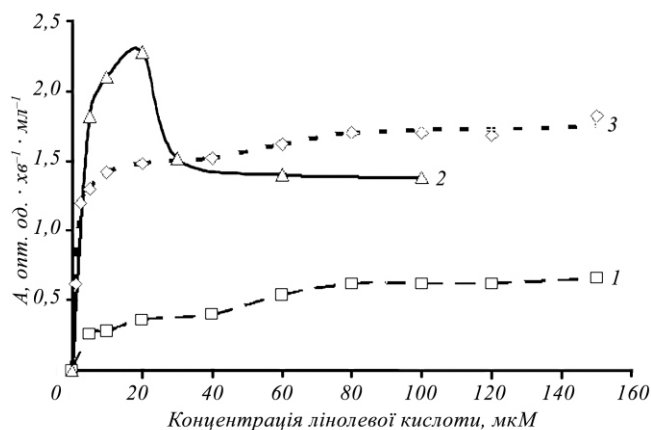


Рис. 1. Залежність активності 9-ЛОГ (1, 3) та 13-ЛОГ (2) з проростків кукурудзи, необроблених (1, 2) та оброблених  $10^{-6}$  М 24-епібрасинолідом (3), від концентрації субстрату (лінолевої кислоти)

класів – перший переважно існує у водорозчинній формі субстрату (іонізовані ПНЖК у концентраціях, нижчих за критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ)), другий – окиснює агреговану форму субстрату (у складі мембран або міцел) [27]. Типовим представником першого класу є 15-ЛОГ із соєвих бобів (LO-1), яка проявляє ферментативну активність за умов лужного рН середовища і окиснює іонізовану форму субстрату у вигляді істинного молекулярного розчину. Інгібуючий вплив на активність цього ферменту спричиняють поверхнево активні сполуки, такі як Tween-20, Brij-35, Lubrol PX, Triton X-100, аерозоль OT тощо. Подібний ефект обумовлений ефективною абсорбцією субстрату з водної фази у міцелярну, а не пряму взаємодією ферменту з детергентом. Представником другого класу є 5-ЛОГ з бульб картоплі, яка каталізує окиснення нерозчинної форми субстрату у складі міцелярної фази, утвореної Lubrol PX [21–25], і проявляє максимальну активність при рН 6,3.

Для встановлення оптимальних умов функціонування 9-ЛОГ з мезокотилію кукурудзи нами визначено залежність стаціонарної швидкості реакції окиснення субстрату – лінолевої кислоти – від рН реакційного середовища та концентрації субстрату за присутності детергенту Lubrol PX. Знайдено, що оптимальним для протікання реакції 9-ліпоксигеназного окиснення лінолевої кислоти є рН 6,0 (даних не наведено), що узгоджується з ре-

зультатами інших авторів [17]. На рис. 1 представлено залежності активності 9-ЛОГ у мезокотиліях проростків кукурудзи необроблених і оброблених  $10^{-6}$  М 24-епібрасинолідом рослин від концентрації лінолевої кислоти. Визначено, що в діапазоні концентрацій лінолевої кислоти 80–150 мкМ різниця у значеннях стаціонарних швидкостей не перевищує 5 %, тому подальші дослідження проводили за присутності лінолевої кислоти у концентрації 100 мкМ, яку вважали насичуючою для ферменту за даних умов. Отже, для вивчення впливу 24-епібрасиноліду та низьких температур на активність 9-ЛОГ у подальших дослідках використовували реакційну суміш, що містила 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 6,0), 0,02 % Lubrol PX та 100 мкМ лінолеву кислоту.

Враховуючи відмінність у субстратній специфічності 9- та 13-ЛОГ кукурудзи [17], нами проведено порівняльний аналіз стаціонарних швидкостей реакцій окиснення арахідонової та лінолевої кислот. Встановлено, що стаціонарна швидкість окиснення арахідонової кислоти за даних умов становить усього  $1,53 \pm 0,46$  % від стаціонарної швидкості окиснення лінолевої кислоти, що свідчить про відсутність прояву активності іншого ферменту – 13-ЛОГ. Як відомо [17], 13-ЛОГ кукурудзи здатна використовувати як специфічний субстрат не тільки лінолеву кислоту, а й арахідонову. З огляду на те, що частка водорозчинної форми арахідонової кислоти при рН 6,0 у системі, що містить міцели Lubrol PX, досить незначна порівняно з мембранозв'язаною, підбір умов для визначення активності 13-ЛОГ здійснювали за відсутності детергенту, спроможного абсорбувати ПНЖК і таким чином виводити її із сфери реакції. Виявлено, що оптимальними умовами проходження реакції окиснення за присутності ферменту є рН 7,0 (даних не наведено) та 20 мкМ лінолева кислота в інкубаційному середовищі (крива 2, рис. 1). Порівняльне визначення стаціонарних швидкостей реакцій окиснення арахідонової та лінолевої кислот за даних умов показало, що стаціонарна швидкість окиснення арахідонової кислоти становить  $100,8 \pm 10,1$  % від стаціонарної швидкості окиснення лінолевої кислоти, що свідчить про прояв активності 13-ЛОГ кукурудзи. Лінолева кислота в концентраціях, що

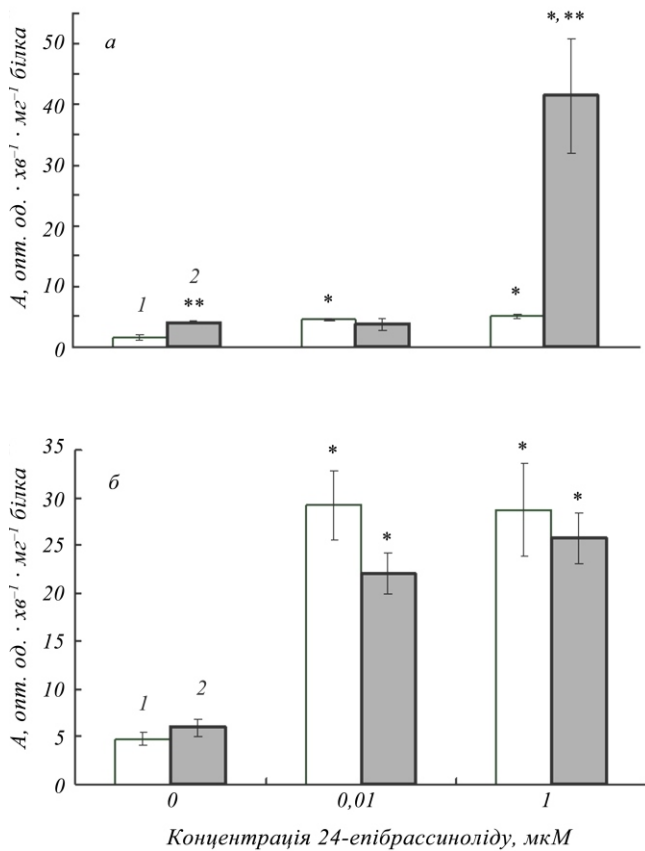


Рис. 2. Вплив 24-епібрасиноліду на активність ліпоксигеназ (13-ЛОГ (а) та 9-ЛОГ (б)) з проростків кукурудзи за нормальних умов вирощування рослин (1) та при низькотемпературному стресі (2),  $M \pm m$  ( $n = 3-6$ ). \*Зміни статистично достовірні,  $p < 0,05$  (за умов однакової температури: 25 °С та 5 °С); \*\*зміни статистично достовірні,  $p < 0,05$  (за умов однакової концентрації 24-епібрасиноліду)

перевищують 20 мкМ, різко пригнічує швидкість 13-ЛОГ реакції (крива 2, рис. 1). Останнє обумовлено тим, що величина ККМ для молекул лінолевої кислоти при рН 7,0 є більшою за 20 мкМ [19], а за таких умов відбувається утворення міцел лінолевої кислоти і виведення субстрату із зони взаємодії з ферментом. У подальшому для порівняння активності 13-ЛОГ, виділених з необроблених та оброблених 24-епібрасинолідом і вирощених за нормальних і низьких температур проростків кукурудзи, використовували реакційну суміш, що містить 0,1 М натрій-фосфатний буферний розчин (рН 7,0) та 20 мкМ лінолеву кислоту.

Результати дослідження впливу 24-епібрасиноліду на активність 9- і 13-ЛОГ з мезокотилію проростків кукурудзи за нормальних умов вирощуван-

ня рослин та за дії низькотемпературного стресу наведено на рис. 2. Показано, що активність ЛОГ з мезокотилію рослин, оброблених 24-епібрасинолідом у концентраціях  $10^{-8}$  і  $10^{-6}$  М, за нормальних умов вирощування проростків зростає більш ніж утричі (13-ЛОГ, рис. 2, а) та більш ніж у 6 разів (9-ЛОГ, рис. 2, б). За умов низькотемпературного стресу активність 9-ЛОГ під впливом 24-епібрасиноліду ( $10^{-8}$  і  $10^{-6}$  М) підвищується в 4 рази порівняно з контролем, у той час як активність 13-ЛОГ зростає майже в 10 разів під дією  $10^{-6}$  М 24-епібрасиноліду, а при  $10^{-8}$  М змін не спостерігається.

Порівняльний аналіз активності 13-ЛОГ за температур 25 і 5 °С виявив сумісний ефект низької температури та 24-епібрасиноліду ( $10^{-6}$  М), який втричі перевищує ефект дії сполуки за  $t = 25$  °С. Навпаки, активність 9-ЛОГ на фоні низької температури зростає меншою мірою (в 1,4 разу менше, ніж за  $t = 25$  °С). Зіставлення дії 24-епібрасиноліду ( $10^{-6}$  М) на активність 13-ЛОГ при температурах 25 і 5 °С виявило восьмиразове зростання в умовах низької температури, тоді як достовірних змін в активності 9-ЛОГ не виявлено. Більш виражений стимулювальний ефект дії 24-епібрасиноліду ( $10^{-6}$  М) на 13-ЛОГ на фоні низької температури свідчить про інтенсифікацію 13-ЛОГ-шляхів перетворення ПНЖК за таких умов. Оскільки 13-ЛОГ є ключовим ферментом синтезу жасмонової кислоти, вірогідним видається підвищення рівня останньої за дії 24-епібрасиноліду на рослинну клітину при впливі холоду. Ефект дослідженої сполуки на 9-ЛОГ є теж стимулювальним, але майже однаковим за різних температур. Наші результати вказують на залучення ліпоксигеназної системи до відповіді рослинної клітини на дію 24-епібрасиноліду, зокрема, за умови зниження температури середовища.

З літературних джерел відомо, що, крім участі в процесах росту та розвитку, БС захищають рослину від різноманітних стресових факторів, а саме – високої та низької температур, посухи, підвищеної концентрації солі, механічних ушкоджень [16, 28, 29]. ЛОГ також беруть активну участь в адаптації рослин до дії стресових чинників [4–7]. Продукти 9- і 13-ЛОГ (9- і 13-гідроперокси ПНЖК) у рослинній клітині залучаються до наступних ферментативних процесів, результатом яких є утворення



низки біологічно активних речовин під загальною назвою оксиліпіни [3, 30]. Одним із кінцевих продуктів ліпоксигеназного каскаду є жасмонова кислота та її похідні (жасмонати) [2, 3, 30]. Дія жасмонатів забезпечує адаптацію рослинного організму до стресів як безпосереднім впливом на активність певних ферментів, так і опосередкованим ефектом, що реалізується в індукції експресії генів [9–12]. Біосинтез жасмонової кислоти ініціюється окисненням ліноленової кислоти до 13-гідропероксиду ліноленової кислоти під дією 13-ЛОГ, до каскаду ферментативних реакцій причетна 10, 11-редуктаза 12-оксофїтодієнової кислоти (OPR) [15, 31]. БС стимулюють експресію стрес-залежних генів *OPR3*, *LOX2* та ін., що свідчить про вплив БС на синтез жасмонової кислоти [14–16].

Відомо, що 24-епібрасинолід спричиняє збільшення рівня продуктів ліпоксигеназного окиснення, тоді як 4-бромофенацилбромід, інгібітор фосфоліпази А<sub>2</sub>, суттєво знижує кількість ліпоксигеназних метаболітів [13]. Автори вважають, що оксиліпінова відповідь клітини пояснюється скоріше змінами ферментативної активності (можливо, як результат фосфорилування/дефосфорилування ферментів або переведення їх з проферментної форми), аніж індукваними 24-епібрасинолід- та 4-бромофенацилбромідом змінами у рівні їхнього біосинтезу. З іншого боку, встановлено вплив продуктів ліпоксигеназного метаболізму, зокрема, 9(Z)-12-гідрокси-9-додеценної кислоти (12-ГДК) та метилжасмонату на фосфорилування білків рослин [32, 33]. Фосфорилування білків за дії 12-ГДК може вказувати як на існування протеїнкіназ, що активуються даною сполукою безпосередньо, так і на ініціацію сукупності сигнальних систем клітини (аденілатциклазної, кальцієвої, НАДФ-оксидазної та, можливо, «власної» ліпоксигеназної). Цікавим є і той факт, що рівень фосфорилування білка з молекулярною масою 15 кДа зростає більш ніж у 10 разів за низької температури, що супроводжується підвищенням морозостійкості рослин [34].

Отже, за літературними даними та у відповідності до отриманих нами результатів, індуквана 24-епібрасинолідом зміна активності 9- і 13-ЛОГ, може свідчити про ініціацію цілої сукупності сигнальних систем клітини, зокрема, ЛОГ-сигнальної

системи, що має забезпечити реалізацію антистресових програм при адаптації рослини до несприятливих умов зовнішнього середовища. Отримані нами відомості про залучення 9- і 13-ЛОГ-шляхів перетворення ПНЖК до формування відповіді рослинної клітини на дію БС за умов низькотемпературного стресу розширюють існуючі на сьогодні уявлення щодо механізму впливу БС на рослинну клітину при низьких температурах.

**Висновки.** Досліджено вплив 24-епібрасиноліду на активність 9- і 13-ЛОГ з мезокотилу проростків кукурудзи за нормальних умов та за дії низькотемпературного стресу. Встановлено, що активність 9- і 13-ЛОГ з мезокотилу рослин, оброблених 24-епібрасинолідом у концентраціях 0,01 і 1 мкМ, за нормальних умов вирощування проростків зростає в 3 і 6 разів відповідно. За умов низькотемпературного стресу активність 9-ЛОГ під впливом 24-епібрасиноліду підвищується в 4 рази порівняно з контролем, у той час як активність 13-ЛОГ зростає більш ніж у 10 разів при дії 1 мкМ 24-епібрасиноліду. Підвищення активності ферментів при введенні 24-епібрасиноліду за дії низькотемпературного стресу може бути свідченням потенційного зв'язку між впливом БС та рівнем окиснених похідних ПНЖК, що утворюються в результаті ліпоксигеназних реакцій.

Виконання роботи підтримано грантом ДФФД № Ф14/247-2007.

*V. N. Kopich, S. V. Kretynin, O. V. Kharchenko,  
R. P. Litvinovskaya, N. M. Chashina, V. A. Khripach*

Effect of 24-epibrassinolide on lipoxygenase activity in maize seedlings under cold stress

Summary

**Aim.** To investigate 24-epibrassinolide influence on the maize seedlings 9- and 13-lipoxygenases activity (9- and 13-LOX) under normal conditions (25 °C) and cold stress (5 °C). **Methods.** LOX activity was measured after treatment of seedlings with 0.01 and 1 mM 24-epibrassinolide. The enzymes were extracted from maize seedlings with 0.1 M sodium acetate (pH 4.5) buffer, supplemented with a non-ionic detergent (0.1 % Brij-99) and EDTA (0.1 mM). The 9- and 13-LOX activities were determined spectrophotometrically at 234 nm using linoleic acid as substrate at pH 6.0 and 7.0 in the presence or absence of 0.02 % Lubrol PX. **Results.** 3-6-fold increase in LOX activity of 24-epibrassinolide-treated seedlings was demonstrated under normal conditions. Cold stress in the presence of 1 μM 24-epibrassinolide enhances the activities of 9- and 13-LOX by 4 and 10 times, respectively. **Conclusions.** The results obtained enlarge our understanding of possible pathways of LOX

metabolites involvement in the formation of cell response to brassinosteroids.

Keywords: linoleic acid, lipoxygenase, 24-epibrassinolide, activation, cold stress.

В. Н. Копич, С. В. Кретицин, О. В. Харченко,  
Р. П. Литвиновская, Н. М. Чащина, В. О. Хрипач

Влияние 24-эпібрассинолида на липоксигеназную активность в проростках кукурузы при действии низкотемпературного стресса

Резюме

**Цель.** Исследование влияния 24-эпібрассинолида на активность 9- и 13-липоксигеназ (9- и 13-ЛОГ) из проростков кукурузы при нормальных условиях (25 °C) и при действии низкотемпературного стресса (5 °C). **Методы.** Активность ЛОГ измеряли после обработки проростков 0,01 и 1 мкМ 24-эпібрассинолидом. Ферменты экстрагировали из проростков кукурузы в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 4,5) в присутствии неионного детергента (0,1% Brij-99) и ЭДТА (0,1 мМ). Активность ЛОГ определяли спектрофотометрически при 234 нм с использованием линолевой кислоты в качестве субстрата (pH 6,0 и 7,0) в присутствии и в отсутствие 0,02 % Lubrol PX соответственно. **Результаты.** Показано, что в нормальных условиях в обработанных 24-эпібрассинолидом проростках активность ЛОГ возрастает в 3–6 раз. При действии низкотемпературного стресса в присутствии 1 мкМ 24-эпібрассинолида активность 9- и 13-ЛОГ увеличивается в 4 и 10 раз соответственно. **Выводы.** Полученные в настоящей работе результаты расширяют существующие на сегодня представления о возможном пути вовлечения метаболитов ЛОГ в формирование клеточного ответа на действие брассиностероидов.

Ключевые слова: линолевая кислота, липоксигеназа, 24-эпібрассинолид, активация, низкотемпературный стресс.

## ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

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. Grechkin A. N., Tarchevsky I. A. The lipoxygenase signaling system // Russ. J. Plant Physiol.–1999.–**46**, N 1.–P. 114–123.
4. Lee S. H., Ahn S. J., Im Y. J., Cho K., Chung G. C., Cho B. H., Han O. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots // Biochem. Biophys. Res. Commun.–2005.–**330**, N 4.–P. 1194–1198.
5. 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**, N 14.–P. 3767–3779.
6. Porta H., Rueda-Benitez P., Campos F., Colmenero-Flores J. M., Colorado J. M., Carmona M. J., Covarrubias A. A., Rocha-Sosa M. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions // Plant and Cell Physiol.–1999.–**40**, N 8.–P. 850–858.
7. Ben-Hayyim G., Gueta-Dahan Y., Avsian-Kretchmer O., Weichert H., Feussner I. Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells of *Citrus sinensis* L. Osbeck // Planta.–2001.–**212**, N 3.–P. 367–375.
8. Reymond P., Farmer E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression // Curr. Opin. Plant Biol.–1998.–**1**, N 5.–P. 404–411.
9. Nishiuchi T., Hamada T., Kodama H., Iba K. Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid -3 fatty acid desaturase gene (FAD7) through different signal transduction pathways // Plant Cell.–1997.–**9**, N 10.–P. 1701–1712.
10. Melan M. A., Dong X., Endara M. E., Davis K. R., Ausubel F. M., Peterman T. K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate // Plant Physiol.–1993.–**101**, N 2.–P. 441–450.
11. Bell E., Creelman R. A., Mullet J. E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–1995.–**92**, N 19.–P. 8675–8679.
12. Laudert D., Weiler E. W. Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling // Plant J.–1998.–**15**, N 5.–P. 675–684.
13. Fedina E. O., Karimova F. G., Chechetkin I. R., Tarchevskij I. A., Khripach V. A. The contribution of lipoxygenase metabolism in the brassinosteroid signaling pathway // Dokl. Akad. Nauk. RAN.–2004.–**395**, N 2.–P. 266–269.
14. Mussig C., Biesgen C., Lisso J., Uwer U., Weiler E. W., Altmann T. A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis // J. Plant Physiol.–2000.–**157**, N 2.–P. 143–152.
15. Schaller F., Biesgen C., Mussig C., Altmann T., Weiler E. W. 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis // Planta.–2000.–**210**, N 6.–P. 979–984.
16. Mussig C., Lisso J., Coll-Garcia D., Altmann T. Molecular analysis of brassinosteroid action // Plant Biol.–2006.–**8**, N 3.–P. 291–296.
17. Poca E., Rabinovitch-Chable H., Cook-Moreau J., Pages M., Rigaud M. Lipoxygenases from *Zea mays* L. Purification and physicochemical characteristics // Biochim. Biophys. Acta – Lipids and Lipid Metabolism.–1990.–**1045**, N 2.–P. 107–114.
18. 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**, N 1–2.–P. 248–254.
19. Schilstra M., Veldink G., Vliegenthart J. Effect of nonionic detergents on lipoxygenase catalysis // Lipids.–1994.–**29**, N 4.–P. 225–231.
20. 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**, N 2.–P. 343–349.
21. Butovich I. A., Kharchenko O. V., Naboka Y. N., Kazachkov M. G. Characterization of the substrate aggregation state in 5-lipoxygenase oxidation of linoleic acid // Ukr. Biokhim. Zh.–2001.–**73**, N 2.–P. 39–43.
22. Kharchenko O. V., Kulichenko H. I., Butovych I. A. Kinetic mechanisms of linoleic acid oxidation by 5-lipoxygenase from *Solanum tuberosum* L. // Ukr. Biokhim. Zh.–1999.–**71**, N 4.–P. 40–44.

23. *Kharchenko O. V., Skaterna T. D., Kazachkov M. G., Butovich I. A.* The role of 4-hydroxy-TEMPO in the reaction of the linoleyl alcohol oxidation by potato tuber 5-lipoxygenase // *Biopolym. cell.*—2001.—**17**, N 2.—P. 147–151.
24. *Vovk A. I., Kharchenko O. V., Kharitonenko A. I., Kukhar V. P., Babii L. V., Kazachkov M. G., Melnyk A. K., Khilchevsky A. N.* Hydrophobic nitroxyl radicals inhibit linoleyl alcohol oxidation by 5-lipoxygenase // *Russ. J. Bioorg. Chem.*—2004.—**30**, N 4.—P. 391–395.
25. *Kharchenko O. V., Kharitonenko A. I., Vovk A. I., Kukhar V. P., Babii L. V., Khilchevskyi A. N., Melnyk A. K.* Inhibiting properties of stable nitroxyl radicals in reactions of linoleyl acid and linoleyl alcohol oxidation catalyzed by 5-lipoxygenase // *Ukr. Biokhim. Zhur.*—2005.—**77**, N 1.—P. 52–57.
26. *Butovich I. A., Tsys' E., V., Mogilevich T. V., Kukhar V. P.* The influence of physicochemical factors on linoleic acid oxidation by lipoxygenase // *Bioorg. Khim.*—1991.—**17**, N 10.—P. 1273–1280.
27. *Butovich I. A., Kharchenko O. V., Babenko V. M.* On the interfacial phenomena in lipoxygenase catalysis // *Adv. Prostagland. Thromb Leuk. Res.*—1995.—**23**.—P. 159–161.
28. *Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A.* Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // *Ann. Bot.*—2000.—**86**, N 3.—P. 441–447.
29. *Schaller H.* The role of sterols in plant growth and development // *Prog. Lipid Res.*—2003.—**42**, N 3.—P. 163–175.
30. *Tarchevsky I. A.* *Plant Cell Signaling Systems.*—M.: Nauka, 2002.—294 p.
31. *Farmer E. E., Ryan C. A.* Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors // *Plant Cell.*—1992.—**4**, N 2.—P. 129–134.
32. *Karimova F. G., Tarchevsky I. A., Mursalimova N. U., Grechkin A. N.* Effect of 12-hydroxydodecenoic acid, a product of the lipoxygenase pathway, on plant protein phosphorylation // *Russ. J. Plant Physiol.*—1999.—**46**, N 1.—P. 128–131.
33. *Tarchevsky I. A., Karimova F. G., Grechkin A. N., Moukhmetchina N. U.* Influence of (9Z)-12-hydroxy-9-dodecenoic acid and methyl jasmonate on plant protein phosphorylation // *Biochem. Soc. Transact.*—2000.—**28**, N 6.—P. 870–871.
34. *Monroy A. F., Sarhan F., Dhindsa R. S.* Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression: Evidence for a role of calcium // *Plant Physiol.*—1993.—**102**, N 4.—P. 1227–1235.

УДК 581.19

Надійшла до редакції 15.04.09