

УДК 577.218 + 577.151.042:577.152.193

## ВПЛИВ ІОНІВ МІДІ НА ПЕРЕКИСНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У *CAT2* НОКАУТНОГО МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA*

І.М. ДОЛІБА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,  
 Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
 Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2  
 e-mail: irina.panchuk@gmail.com

**Мета.** Стресові білки рослин, як правило, кодуються мультигенними родинами, але специфічні метаболічні функції окремих ізоферментів часто залишаються погано зрозумілими. Для того, щоб з'ясувати, чи є окремі ізоформи каталази необхідними для захисту рослин, або, навпаки, вони можуть функціонально замінити одна одну, було зіставлено реакцію рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу та нокаутного мутанта за геном *Cat2* на стрес, спричинений іонами міді. **Методи.** Вимірювали накопичення іонів міді в листках та рівень перекисного окислення ліпідів мембран при різних варіантах обробки рослин хлоридом міді. **Результати.** Встановлено, що накопичення іонів міді активує перекисне окислення ліпідів у листках арабідопсису. Цікавим видається той факт, що у *Cat2* нокаутних мутантів із зниженою активністю каталази максимальний рівень перекисного окислення ліпідів після застосування 5 мМ хлориду міді виявився нижчим, ніж у рослин дикого типу. **Висновки.** Отримані дані свідчать, що в умовах стресу, спричиненого іонами міді, у мутанта активуються альтернативні захисні механізми, які успішно компенсують втрату ізоформи *CAT2*.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, каталаза, мідь, перекисне окислення ліпідів, мультигенні родини, нокаутні мутанти.

**Вступ.** Останнім часом все більше спостерігається забруднення навколишнього середовища важкими металами (ВМ), частина яких належить до мікроелементів, необхідних для життєдіяльності рослин. Проте у концентраціях вищих за оптимальні ці елементи є токсичними [1, 2], оскільки можуть негативно впливати на перебіг багатьох біохімічних процесів [3 – 5]. Одним із таких ВМ є мідь, яка за умов *in vivo* здатна змінювати валентність та каталізувати утворення активних форм кисню (АФК), зокрема гідроксил радикалу [1, 6, 7]. Відомо, що зростання рівня АФК призводить до підсилення перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран [8]. Така активація ПОЛ є неспецифічною реакцією рослинних організмів на вплив багатьох несприятливих факторів біотичної та абіотичної природи, в тому числі – на дію іонів ВМ у підвищених концентраціях [10].

Захист від оксидативного стресу, спричиненого підвищенням рівня АФК, у рослинній клітині забезпечує антиоксидантна система [7, 10, 11], до якої зокрема належать антиоксидантні ферменти. Одним із ферментів, що розщеплюють пероксид водню є каталаза (*CAT*). У *Arabidopsis thaliana* відомо три гени *Cat1*,

*Cat2* та *Cat3*, що кодують три ізоформи САТ. Серед цих ізоформ 70 % загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків арабідопсису припадає на САТ2 [12, 13].

Вважається, що САТ відіграє важливу роль у захисті рослинної клітини від стресових факторів, які спричиняють зростання рівня пероксиду водню та інших АФК. Збільшення активності САТ виявлено у відповідь на дію різноманітних стресових чинників абіотичної природи [14 – 17, 21]. Зокрема, для багатьох рослин продемонстровані зміни активності САТ та інших антиоксидантних ензимів у відповідь на зростання концентрації іонів  $\text{Cu}^{2+}$  [19 – 22].

У *A. thaliana* показано індукцію генів *Cat* за дії озону, засолення, посухи та після обробки абсцизовою кислотою [14, 15]. Проте, яку роль у стресовій відповіді відіграють окремі ізоформи, вивчено ще недостатньо. Застосування нокаутних мутантів із порушеною експресією окремих генів відкриває нові можливості для з'ясування функції окремих ізоформ того чи іншого білка. Для з'ясування ролі ізоформ САТ у захисті рослин в умовах стресу, спричиненого дією підвищених концентрацій іонів  $\text{Cu}^{2+}$  ми дослідили процеси ПОЛ у рослин *A. thaliana* дикого типу та у нокаутної лінії з відсутністю ізоформою САТ2.

### Матеріали і методи

Для дослідження впливу міді використовували 4,5–5-тижневі рослини *A. thaliana* (L.) Неупн дикого типу (ДТ: екотип Columbia 0) та гомозиготну лінію КО-*Cat2*, яка є Т-ДНК нокаутним мутантом за геном *Cat2* (At1g20620). Насіння лінії КО-*Cat2* було люб'язно надано нам Др. Ульріке Центграф (Центр молекулярної біології рослин, м. Тюбінген, Німеччина).

Рослини вирощували у ґрунті в культивційній кімнаті за температури 20 °С,

освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня.

Для того, щоб отримати інформацію про ранню стадію стресової відповіді та з'ясувати первинні реакції рослинної клітини на дію підвищених концентрацій іонів  $\text{Cu}^{2+}$ , обробку рослин проводили за умов, що забезпечують швидке надходження іонів  $\text{Cu}^{2+}$  до тканин листків. Відомо, що коренева система має бар'єрну функцію і вибірково перешкоджає надходженню іонів ВМ у пагони [23 – 25]. Тому для забезпечення швидкого надходження іонів  $\text{Cu}^{2+}$  у листки арабідопсису ми інкубували зрізану надземну частину рослин на рідкому середовищі Мурасіге-Скуга (0,5x MS), що містило хлорид міді у концентраціях 0,1; 0,5 або 5 мМ. Обробку проводили у темряві за температури 20 °С протягом 2 (короткотривалий стрес) та 12 (довготривалий стрес) год. Як показує досвід нашої лабораторії, 2 год відповідають мінімальному часу, за якого слід очікувати накопичення токсиканту та розвитку стресової відповіді у листках. Контрольні рослини інкубували на середовищі без додавання хлориду міді. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморожували безпосередньо після зрізання.

Вміст іонів міді у рослин арабідопсису ДТ визначали методом атомної абсорбції за ГОСТ 30178-96 за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра С-115М. Підготовку проб здійснювали методом сухої мінералізації за ГОСТ 29629-94, який полягає у повному розкладі органічних речовин шляхом «згорання» проби за високої температури. Для досліджень брали наважку рослинного матеріалу 2–3 г. Після проведення обробки рослин хлоридом міді проби висушували за температури 150 °С. Подальшу мінералізацію проб проводили у муфельній печі поступово підвищуючи температуру через кожні 30 хв на 50 °С до кінцевої температури 450 °С та мінералізували протягом 10–15 год. Після охоло-

дження до кімнатної температури до отриманої золи додавали концентровану азотну кислоту у співвідношенні 1:1. Проби випарювали на водяній бані і висушували; отриману золу прогрівали 30 хв за 300 °С. Паралельно готували контрольну пробу, яка не містила рослинного матеріалу. Аналітична довжина хвилі світла для вимірювання концентрації міді становила 324,7 нм.

Визначення вмісту тіобарбітурат-активних продуктів (ТБКАП) проводили за описаним методом [26]. Для екстрагування ТБКАП до 1 мл 96 % ацетону додавали 100 мг рослинного матеріалу, розтертого в рідкому азоті та центрифугували при +4 °С за 14 000 г протягом 15 хв. Супернатант переносили у чисту центрифужну пробірку, додавали 500 мкл дистильованої води та 1,5 мл 0,5 % тіобарбітурової кислоти в 20 % трихлороцтовій кислоті. Проби інкубували на киплячій водяній бані протягом 30 хв, доводили 96 % ацетоном до 3 мл та охолоджували на льоду 10 хв. Після цього проби центрифугували 10 хв при 3000 г та переносили надосадову рідину у чисті пробірки. Паралельно готували холосту контрольну пробу без додавання рослинного матеріалу. Оптичну щільність отриманих проб визначали на спектрофотометрі СФ-46 (Ленінград) за довжин хвиль 440, 532 та 600 нм і розраховували вміст ТБКАП як описано у роботі Du and Bramlage [26].

Всі експерименти виконували у п'яти біологічних та трьох аналітичних повторностях. Статистичну достовірність отриманих даних оцінювали з використанням критерію Ст'юдента [27].

## Результати та обговорення

Першим кроком у вивченні гострого стресу була розробка умов експерименту, за яких можливо досягти швидкого надходження іонів  $\text{Cu}^{2+}$  до рослин. Враховуючи, що коренева система є бар'єром, який перешкоджає надходженню іонів ВМ до пагонів, для експериментів було застосовано рослини із відокремленою кореневою системою.

Отримані результати показали, що за інкубації на середовищі із додаванням хлориду міді вже через 2 год від початку експерименту у тканинах листків накопичуються іони міді у порівняно високих концентраціях (рис. 1). При використанні найменшої концентрації 0,1 мМ вміст іонів  $\text{Cu}^{2+}$  у листках *A. thaliana* дорівнював їхній концентрації в інкубаційному середовищі. При збільшенні часу обробки до 12 год спостерігали подальше накопичення іонів міді. Так, при використанні для обробки 0,1 та 0,5 мМ хлориду міді його концентрація у листках ставала в 1,6–1,9 раза вище, ніж у середовищі. І лише при використанні 5 мМ розчину солі концентрація іонів міді у тканинах була на

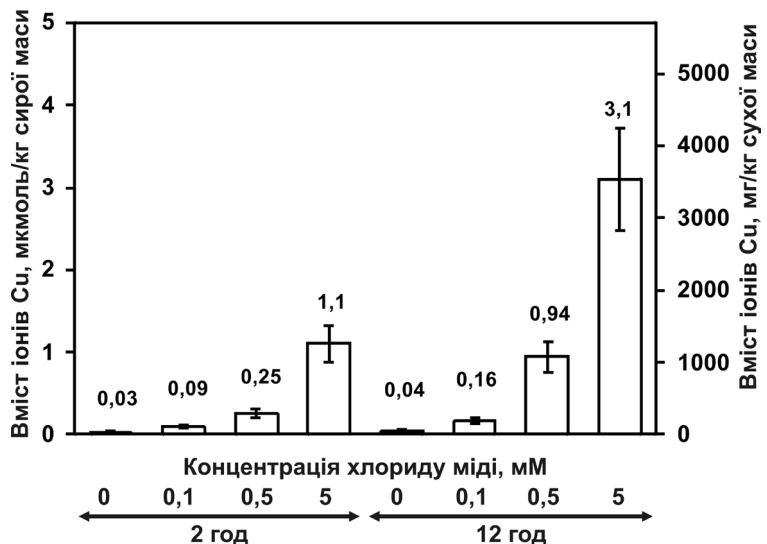
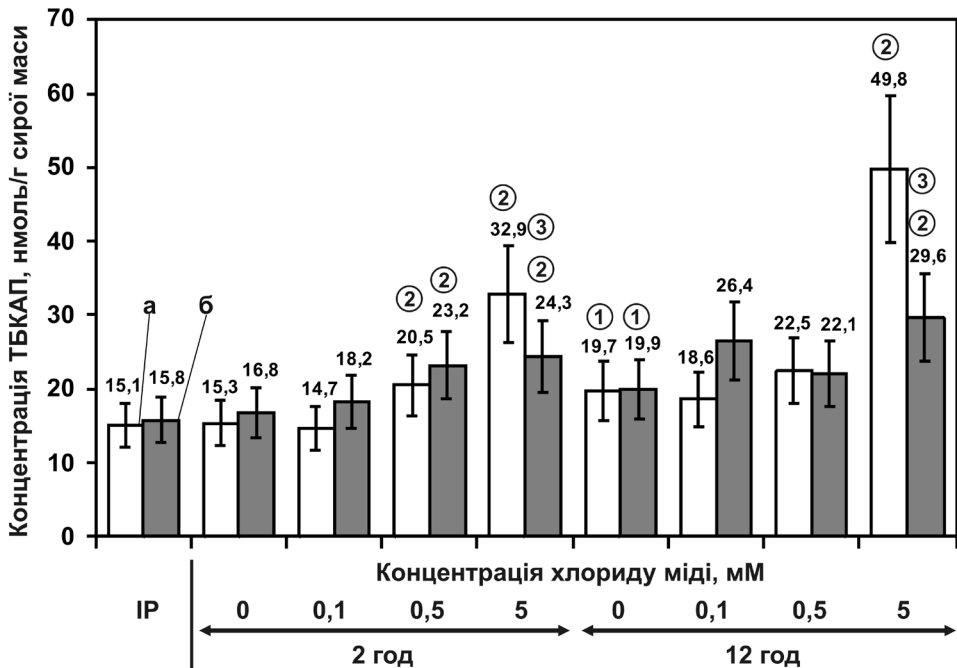


Рис. 1. Накопичення іонів міді у листках *A. thaliana* за дії 0,1; 0,5 та 5 мМ хлориду міді протягом 2 та 12 год. Різниця у вмісті іонів міді між контрольними та дослідними рослинами достовірна у всіх варіантах обробки

третину нижче, ніж у середовищі. Для порівняння вкажемо, що за дії на проростки кукурудзи 0,08–0,8 мМ сульфату міді протягом 3 діб концентрація іонів  $\text{Cu}^{2+}$  хоча й помітно зростала, але залишалась приблизно в 10 раз нижче, ніж у середовищі [28]. Отже, застосування для досліджень рослин з відокремленою кореневою системою дійсно дозволяє досягти швидкого надходження до листків іонів  $\text{VM}$  у високих концентраціях.

Визначення концентрації ТБКАП показало, що по цьому параметру між 5 тижневими інтактними рослинами ДТ і *KO-Cat2* різниці немає (рис. 2). У наших попередніх дослідженнях показано, що активність САТ у мутантної лінії *KO-Cat2* складає 58 % від активності у рослин ДТ і пов'язана з ізoформою САТ3. При цьому активність аскорбат пероксидази (АРХ), іншого антиок-

сидантного ензиму, задіяного у знешкодженні пероксиду водню, у мутантної лінії порівняно з ДТ практично не змінюється, тобто не компенсує зменшення активності САТ [25]. Враховуючи вищесказане, варто було очікувати, що порушення експресії гена *Cat2* у мутантної лінії *KO-Cat2* буде позначатись на параметрах оксидативного стресу, зокрема – впливати на рівень ПОЛ у мембранах, який є індикатором рівня АФК у клітині [8]. Проте отримані дані свідчать, що за оптимальних умов вирощування, при яких культивувались інтактні рослини, рівень ПОЛ у мутантної лінії не зростає, отже залишкової каталазної активності достатньо для ефективного розщеплення пероксиду водню. Альтернативним поясненням може бути активація інших захисних механізмів, які обмежують рівень ПОЛ у нокаутної лінії *KO-Cat2*.



**Рис. 2.** Вплив хлориду міді у концентраціях 0, 1; 0,5 та 5 мМ на вміст ТБКАП у рослин *A. thaliana* дикої типу (ДТ) і нокаутної лінії *KO-Cat2*; IP – інтактні рослини. Контрольні зразки інкубували на середовищі MS без додавання хлориду міді. Різниця достовірна між контрольними та інтактними рослинами (1), між стресованими та контрольними рослинами (2), між рослинами ДТ та *KO-Cat2* (3): а – ДТ; б – *KO-Cat2*

В умовах 2-годинної дії 0,5 та 5 мМ хлориду міді у рослин обох ліній арабідопсису спостерігалось зростання вмісту ТБКАП зі збільшенням концентрації металу. Найбільший вплив на вміст ТБКАП справляла концентрація 5 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  – збільшення становило 115 % у рослин ДТ та 45 % у КО-*Cat2*. Збільшення вмісту ТБКАП відбувалось також і за дії 12-годинного стресу. Максимальне зростання спостерігали за дії найвищої концентрації хлориду міді 5 мМ і відповідало зростанню рівня ТБКАП у 2,5 рази у ДТ та у 1,5 рази у КО-*Cat2*.

У контрольній групі рослин, які інкубувались протягом 12 год на середовищі MS без додавання хлориду міді виявлено підвищення вмісту ТБКАП у обох досліджуваних лініях на 26–30 % порівняно з інтактними рослинами. Це може свідчити про те, що відокремлення кореневої системи та подальше інкубування надземної частини на поживному середовищі у темряві є свого роду стресом, який зокрема призводить до активації ПОЛ.

Відомо, що за тривалої дії на рослини підвищених концентрацій іонів ВМ вміст ТБКАП зростає залежно від часу вирощування та концентрації [10, 20, 29]. У наших експериментах в умовах швидкого надходження високих концентрацій іонів  $\text{Cu}^{2+}$  до листків 5 тижневих рослин *A. thaliana* спостерігали аналогічний ефект: зростання концентрації ВМ у клітині зумовлювало збільшення рівня ТБКАП. Імовірно, це пов'язано із тим, що мідь здатна генерувати у клітині гідроксид радикали, які є сильним індуктором ПОЛ. Але несподіваним було те, що за дії найвищої концентрації іонів  $\text{Cu}^{2+}$  рівень ТБКАП виявився нижчим у рослин КО-*Cat2* порівняно з ДТ. Отже, у мутантної лінії *A. thaliana* суттєве зниження каталазної активності, пов'язане із втратою експресії ізоформи CAT2, не спричиняє активації ПОЛ. Імовірним поясненням цього може бути активація у мутанта альтернативних механізмів знешкодження АФК, які є навіть ефективнішими, ніж ті, що функці-

онують у рослин ДТ, або зменшення генерації АФК. Розкриття природи цих компенсаторних механізмів потребує подальших досліджень.

## Висновки

Швидке накопичення іонів  $\text{Cu}^{2+}$  у надмірних концентраціях спричиняє суттєве підвищення ПОЛ у тканинах листа *A. thaliana*. При цьому у нокаутної лінії КО-*Cat2* із зниженою удвічі каталазною активністю, що пов'язано із втратою експресії ізоформи CAT2, максимальне зростання ПОЛ за дії 5 мМ хлориду міді є меншим, ніж у рослин арабідопсису дикої типу. Це вказує на активацію у мутанта альтернативних механізмів контролю рівню пероксиду водню та ПОЛ.

## Перелік літератури

1. Yruela I., Hall J.L., Williams L.E. Copper in plant // Braz. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 145–156.
2. Hall J.L. Transition metal transporter in plants // J. Exp. Botany. – 2003. – Vol. 54, № 393. – P. 2601–2613.
3. Drazkiewicz M., Skorzynska-Polit E., Krupa Z. Response of ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.) // Plant Sci. – 2003. – Vol. 164. – P. 195–202.
4. Benavides M. P., Gallego S.M., Tomaro M.L. Cadmium toxicity in plants // Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 21–34.
5. Shah K., Nongkynrih J.M. Metal hyperaccumulation and bioremediation // Biologia Plantarum. – 2007. – Vol. 51. – P. 618–634.
6. Mithofer A., Schulze B., Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals // FEBS Letters. – 2004. – Vol. 566. – P. 1–5.
7. Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants // Planta. – 2006. – Vol. 223. – P. 1145–1153.
8. Bagnyukova T.V., Lushchak O.V., Storey K.B., Lushchak V.I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C // J. Thermal Biol. – 2007. – 32. – P. 227–234.
9. Терек О. І., Решетило С., Величко О., Яворська Н. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів у па-

- ростках сої під дією емістиму С в умовах токсичного впливу іонів свинцю та кадмію. // Вісн. Львів. ун-ту. – Львів: 2004. – Вип. 37: Сер. Біологічна. – С. 218–221.
10. John R., Ahmad P., Gadgila K., Sharma S. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. // Internat. J. Plant Product. – 2009. – Vol. 3, № 3. – P. 65–75.
  11. Milla A M. Whelan J. Stress, oxidative stress and mitochondria // Australian Biochemist. – 2000. – Vol. 31, №4. – P. 4–8.
  12. Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Plant Physiol. – 1996. – P. 327–336.
  13. Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression / Scandalios J.G. (ed.) Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P. 343–406.
  14. Scandalios J.G., Acevedo A., Ruzsa S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize // Plant Sci. – 2000. – Vol. 156. – P. 103–110.
  15. Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S. Drought control on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat // J. Exp. Botany – 2005. – Vol. 56, № 411. – P. 417–423.
  16. Scandalios J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // Braz. J. Med. Biol. Research – 2005. – Vol. 38. – P. 995–1014.
  17. Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes // Funct. Plant Biol. – 2005. – Vol. 32. – P. 45–53.
  18. Vandenameele S., Vanderauwera S., Vuylsteke M. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 2004. – Vol. 39, № 1. – P. 45–58.
  19. Chen L.M., Lin C.C., Kao C.H. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzymes activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in roots // Bot. Bull. Acad. Sin. – 2000. – Vol. 41. – P. 99–103.
  20. Lombardi L., Sebastian L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes response of in vitro grown plants // Plant Sci. – 2005. – Vol. 168. – P. 797–802.
  21. Luna C.M., González C.A., Trippi V.S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves // Plant Cell Physiol. – 1994. – Vol. 35, № 1. – P. 11–15.
  22. Wang S-H., Yang Z-M., Yang H. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. // Bot. Bul. Acad. Sin. – 2004. – P. 203–212.
  23. Рогозинский М.С., Костышин С.С., Волков Р.А. Влияние ионов тяжелых металлов на синтез РНК в изолированных клеточных ядрах растений // Физиол. биохим. культурных растений. – 1998. – Т. 30, №3. – С. 209–214.
  24. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиол. растений. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 606–630.
  25. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність каталази та аскорбат пероксидази у *cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію // Вісник УТГіС. – 2011, №2. – С. 200–208.
  26. Du Z., Bramlage W. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts // J. Agricult. Food Chem. – 1992. – Vol. 40. – P. 1566–1570.
  27. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
  28. Язловицька Л.С., Рогозинський М.С., Костишин С.С., Волков Р.А. Вплив Cu та Ni на інтенсивність синтезу РНК у проростках кукурудзи // Укр. біохім. журнал – 1999 – Т. 71, № 1 – С. 56–60.
  29. Paradiso A., Berardino R., de Pinto M.C. Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants // Plant Cell Physiol. – 2008. – Vol. 49, № 3. – P. 362–374.

Представлено О.М. Тищенко  
Надійшла 2.04.2012

#### ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ У *CAT2* НОКАУТНОГО МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA*

И.Н. Долиба, Р.А. Волков, И.И. Панчук

Черновицкий национальный университет имени  
Юрия Федьковича  
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского, 2  
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

**Цель.** Стрессовые белки растений, как правило, кодируются мультигенными семействами, но специфические метаболические функции отдельных изоферментов часто остаются плохо понятными. Для того чтобы выяснить, являются ли отдельные изоформы каталазы необходимыми для защиты растений, или, наоборот, они могут функционально заменять друг

друга, была сопоставлена реакция растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и нокаутного мутанта по гену *Cat2* на стресс, вызванный ионами меди. **Методы.** Изменялись накопление ионов меди в листьях и уровень перекисного окисления липидов мембран при различных вариантах обработки растений хлоридом меди. **Результаты.** Было установлено, что накопление ионов меди активирует перекисное окисление липидов в листьях арабидопсиса. Интересным представляется тот факт, что у *Cat2* нокаутных мутантов с пониженной активностью каталазы максимальный уровень перекисного окисления липидов после применения 5 мМ хлорида меди оказался ниже, чем у растений дикого типа. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют, что в условиях стресса, вызванного ионами меди, у мутанта активируются альтернативные защитные механизмы, которые успешно компенсируют утрату изоформы CAT2.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, каталаза, медь, перекисное окисление липидов, мультигенные семейства, нокаутные мутанты.

EFFECT OF COPPER IONS ON LIPID PEROXIDATION IN *CAT2* KNOCK-OUT MUTANT OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

I. M. Doliba, R. A. Volkov, I. I. Panchuk

Department of Molecular Genetics and Biotechnology

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi  
Kotsubynski str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine  
e-mail: irina.panchuk@gmail.com

**Aims.** Stress proteins in plants are usually encoded by multigene families, but specific metabolic functions of individual isoenzymes often remain poorly understood. In order to clarify if different isoforms of catalase are indispensable for plant protection, or, alternatively, they can functionally substitute each other, copper stress response of *Arabidopsis thaliana* wild type plants and *Cat2* knock-out mutant were compared. **Methods.** Accumulation of copper ions in leaves and the level of membrane lipid peroxidation were measured upon different regimes of plants treatment by copper chloride. **Results.** It was found that accumulation of copper ions activate lipid peroxidation in arabidopsis leaves. Surprisingly, in *Cat2* knock-out mutant possessing reduced catalase activity the maximal level of lipid peroxidation observed after application of 5 mM copper chloride was lower than in wild type plants. **Conclusions.** The data indicate activation of alternative protective mechanisms that upon copper stress effectively compensate the lack of CAT2 in the mutant.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, catalase, copper, lipid peroxidation, multigene families, knock-out mutants.