

УДК 577.152.1:577.218

## ДИФЕРЕНЦІЙНА АКТИВНІСТЬ ІЗОФОРМ КАТАЛАЗИ *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

І.М. БУЗДУГА, Н.О. ДІДЕНКО, 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.** Причини широкої розповсюженості мультигенних родин у геномах рослин прояснені все ще недостатньо. Метою дослідження було з'ясувати специфічну роль ізоформ каталази у ранній відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на дію сольового стресу. **Методи.** Розетки рослин дикого типу і гомозиготної нокаутної лінії *KO-Cat2* (SALK 057998), яка є мутантом по гену каталази *Cat2*, піддавались дії 50, 100 та 200 мМ NaCl протягом 4 та 8 годин. Оцінювали зміни активності каталази. **Результати.** Встановлено, що загальна каталазна активність у листках *KO-Cat2* нокаутних рослин була приблизно вдвічі нижча, ніж у рослин дикого типу. За дії сольового стресу активність CAT у листках дикого типу знижувалась за 4-годинної обробки 50 та 100 мМ NaCl та залишалась на рівні контролю в присутності 200 мМ NaCl. Продовження часу обробки до 8 годин супроводжувалось зростанням каталазної активності. У нокаутної лінії *KO-Cat2* активність CAT зростала вище контрольного рівня за 4-годинної дії 200 мМ NaCl та залишалася незмінною в усіх інших варіантах дослідження. **Висновки.** Активація каталази є одним з елементів ранньої відповіді рослин арабідопсису на сольовий стрес. Ізоформи каталази по-різному активуються на різних етапах розвитку стресової відповіді. Причиною існування декількох ізоформ CAT може бути неможливість поєднання в межах одного промотору різних регуляторних сигналів, необхідних для забезпечення диференційної експресії цього ферменту у відповідь на чисельні зовнішні стимули.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, мультигенні родини, ізоформи каталаза, пероксид водню, сольовий стрес, нокаутні мутанти.

**Вступ.** Для геному рослин характерна наявність мультигенних родин [1–4]. Гени/білки, які належать до однієї родини, можуть виконувати однакові функції, і одночасно вони присутні у геномі лише для підвищення надійності роботи клітини, тобто є функціонально надлишковими. Можливим поясненням існуючого поліморфізму білків є фізіологічна необхідність диференційно змінювати їхню експресію залежно від стадії онтогенезу або змін, що відбуваються в навколишньому середовищі. Зручною моделлю для вивчення проблеми молекулярної надлишковості є гени, експресія яких змінюється за дії абіотичних стресових чинників, таких як підвищення або зниження температури, посуха, засолення ґрунтів тощо. До мультигенних родин належать гени захисних білків, зокрема ферментів антиоксидантного захисту [5–8]. Одним із таких ферментів є каталаза, яка регулює рівень пероксиду водню у рослинній клітині.

Відомо, що рівень  $H_2O_2$  зростає в умовах абіотичного стресу [9, 10], в тому числі – і при засоленні [11, 12]. Пероксид водню є шкідливою молекулою і, вод-

ночас, месенджером, який регулює експресію багатьох генів [9, 13–16]. Відповідно, регуляція його концентрації має центральне значення для захисту клітини та розвитку стресової реакції. Відомо, що в умовах підвищеного накопичення пероксиду водню може змінюватись активність каталази, яка його розщеплює. Проте, роль окремих генів та кодованих ними білків та шляхи регуляції їхньої експресії в умовах стресу вивчені все ще недостатньо.

Моделлю для вивчення функціональної спеціалізації та взаємозамінності окремих ізоформ ферментів слугують мутантні форми із порушеною функцією відповідних генів. У геномі арабідопсису каталаза представлена трьома генами: *Cat1*, *Cat2* та *Cat3*. Найекспресованішою є ізоформа CAT2, на долю якої припадає більше половини загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків, тоді як CAT1 експресується у листках тільки на пізніх етапах онтогенезу [17]. Для з'ясування ролі ізоформ каталази за дії абіотичного стресу ми зосередили увагу на вивченні змін активності CAT у рослин арабідопсису дикого типу та у нокаутного (knock-out) мутанта з порушеною експресією гена *Cat2* у відповідь на стрес, спричинений швидким накопиченням високих концентрацій хлориду натрію у тканинах листа, що призводить до порушення окисно-відновного балансу клітини та виникнення оксидативного стресу [18, 19].

### Матеріали і методи

Для дослідження впливу хлориду натрію використовували 5-тижневі рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh дикого типу (ДТ: екотип Columbia 0) та гомозиготну нокаутну лінію KO-*Cat2* (SALK 057998), яка є мутантом по гену каталази *Cat2*. Насіння цієї лінії було отримано з колекції NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, University of Nottingham, Великобританія). Рослини вирощували в культивацийній кімнаті за температури 20 °C в умовах

16-годинного світлового дня. Інтенсивність освітлення становила 2000 люкс.

Для того, щоб отримати інформацію про ранню стадію стресової відповіді та з'ясувати первинні реакції рослинної клітини на дію підвищених концентрацій хлориду натрію, обробку рослин проводили за умов, що забезпечують його швидке надходження до тканин листків. Відповідно, для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке поживне середовище Мурасіге-Скуга (0,5xMS), що додатково містило хлорид натрію у концентраціях 50, 100 та 200 мМ. Після цього зразки інкубували у темряві за температури 20 °C протягом 4 та 8 годин. Концентрацію хлориду натрію та час обробки підбирали у попередніх експериментах. Контрольні рослини інкубували на середовищі 0,5xMS без додавання хлориду натрію. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморожували у рідкому азоті безпосередньо після зрізання. Для кожного варіанта досліду готували середню пробу з 10–12 рослин.

Екстракцію нативного білка проводили в буфері, що містив 0,1 М трис-HCl (pH=6,8), 20 % гліцерин, 30 мМ дитіотреїтол та 0,1 % нерозчинний полівінілполіпіролідон (ПВПП). Кількість білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [20]. Каталазну активність визначали спектрофотометрично при довжині хвилі  $\lambda=410$  нм на Photometer 1101M (Eppendorf Gerätebau, Німеччина) за методом, описаним нами раніше [21]. Активність ферменту розраховували, порівнюючи вміст пероксиду водню у пробі на початку реакції та після її припинення, та виражали в мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, що розщеплювався за 1 хв. у перерахунку на 1 мг білка.

Експеримент виконували для п'яти незалежно вирощених партій рослин. Для кожного білкового екстракту вимірювання активності та вмісту білка здійснювали тричі. Статистичну достовірність отриманих даних

оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [22].

### Результати та обговорення

У листках 5-тижневих інтактних рослин нокаутної лінії KO-Cat2 активність каталази становила лише 51 % від активності CAT у ДТ (рисунок), що пов'язано з відсутністю у рослин нокаутної лінії ізоформи каталази CAT2. Аналогічний результат отриманий нами раніше для рослин 7-тижневого віку [23]. Отже, у рослин арабідопсису віком 5 та 7 тижнів відносна активність ізоформи CAT2 не змінюється.

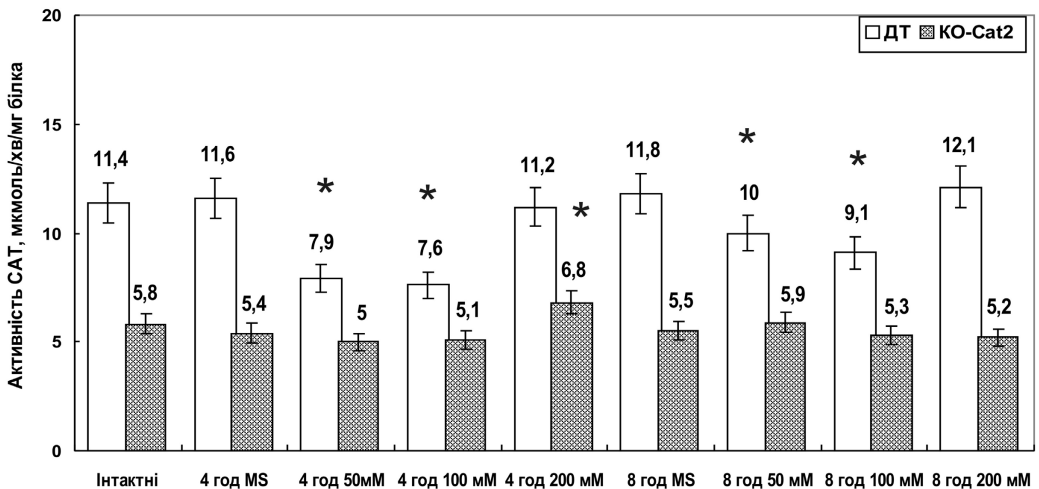
Інкубування рослин у контрольних умовах протягом 4 та 8 год. у середовищі 0,5xMS суттєво не впливало на активність CAT у обох досліджуваних ліній.

Для вивчення ефектів сольового стресу у подальших дослідженнях було застосовано обробку рослин протягом 4 та 8 год. хлоридом натрію у концентраціях 50, 100 та 200 мМ. Використання цих концентрацій відповідає даним, наявним у літературі [24–26]. Крім того, у попередніх експериментах нами було оцінено фізіологічні зміни, що ви-

никають у рослин за умов досліду. Встановлено, що обробка рослин протягом 4 год. NaCl у концентрації 50 та 100 мМ не спричиняла будь-яких помітних змін, тоді як за дії 200 мМ розчину спостерігали ознаки втрати тургору листків. При збільшенні часу обробки до 8 год. ознаки втрати тургору проявлялись і за дії 100 мМ розчину, а у зразків, що зазнали впливу 200 мМ NaCl, вони значно підсилювались. При цьому помітної різниці між ДТ та KO-Cat2 виявлено не було.

В умовах 4-годинного сольового стресу у ДТ за дії NaCl у концентрації 50 та 100 мМ відбувалось зниження активності CAT на 32 та 35 %, відповідно. Проте зі збільшенням концентрації NaCl до 200 мМ зниження активності ферменту не спостерігали – в цьому випадку його активність залишалась практично на рівні контролю. У лінії KO-Cat2 за 4-годинного інкубування в присутності 50 та 100 мМ не виявлено жодних змін каталазної активності. Дія 200 мМ NaCl зумовлювала зростання активності CAT на 26 % вище контрольного рівня.

Більш тривала 8-годинна обробка призводила до зниження активності CAT у ДТ на



**Рисунок.** Активність CAT у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаутної лінії KO-Cat2 за дії сольового стресу. Наведено середні значення, отримані для п'яти незалежних дослідів, та їхні стандартні відхилення; \* – різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна ( $p < 0,05$ )

15 та 23 % при застосуванні 50 та 100 мМ NaCl. При підвищенні концентрації до 200 мМ, як і за 4-годинного стресу, активність CAT залишалась на рівні контролю. У нокаутних рослин KO-Cat2 за дії 8-годинного стресу активність CAT залишалась на рівні контролю незалежно від концентрації NaCl.

Таким чином, отримані результати показують, що за дії хлориду натрію на рослини виникають порушення, які підсилюються при збільшенні застосованої концентрації солі та часу обробки. При цьому спостерігали зміни у активності каталази, характер яких відрізняється у рослин ДТ та лінії KO-Cat2.

Для пояснення отриманих даних слід нагадати, що у рослинній клітині пероксид водню генерується у різних компартментах, а саме – у хлоропластах, пероксисомах, мітохондріях та внаслідок роботи ряду оксидаз у плазматичній мембрані [9, 27]. Вважається, що каталаза, яка у клітинах листка локалізована переважно у пероксисомах, забезпечує захист клітини насамперед від  $H_2O_2$ , який виникає при фотодиханні [9]. За дії сольового стресу відбувається підсилення фотодихання та продукції  $H_2O_2$  у пероксисомах, що призводить до розвитку вторинного оксидативного стресу [11, 12]. Крім того, за дії підвищених концентрацій хлориду натрію зростає утворення  $H_2O_2$  у хлоропластах, мітохондріях, плазматичній мембрані та клітинній стінці, причому цей ефект є світлозалежним [12]. Проте, залишається не до кінця зрозумілим, чому генерація  $H_2O_2$  у мітохондріях, плазматичній мембрані та клітинній стінці має залежати від освітлення.

Для захисту від вторинного оксидативного стресу, спричиненого зростанням концентрації солей у рослин, може спостерігатись активація каталази та інших антиоксидантних ферментів [28–30]. Для прояснення питання, чи може сольовий стрес індукувати таку захисну реакцію за відсутності освітлення і як різні ізоформи CAT реагують на таку обробку, нами було

досліджено вплив хлориду натрію у різних концентраціях на активність каталази у листках арабідопсису ДТ та лінії KO-Cat2, які інкубували у темряві.

Отримані результати показали, що у рослин ДТ за дії 50 та 100 мМ NaCl протягом 4 год. активність каталази не тільки не зростає, а навіть знижується. Для пояснення цього ефекту можна припустити, що за дії порівняно малих доз хлориду натрію вторинний оксидативний стрес не виникає, але відбувається загальне інгібування синтезу білків, в тому числі – каталази. Ці дані узгоджуються із спостереженнями, що у рису за дії 100 мМ NaCl у темряві концентрація пероксиду водню не зростає [12]. Проте застосування для обробки 200 мМ NaCl у наших експериментах не супроводжувалось падінням активності каталази. Це свідчить, що в умовах жорсткішого сольового стресу важливість збереження функцій цього ферменту зростає. Причиною цього може бути збільшення концентрації  $H_2O_2$  за дії найбільшої із застосованих концентрацій хлориду натрію. На користь запропонованої моделі також свідчать дані, отримані для 8-годинної обробки. У цьому випадку для всіх використаних концентрацій NaCl активність каталази виявилась більше, ніж після 4-годинної обробки, хоча у контролі активність не змінювалась. Це вказує на поступовий розвиток захисної відповіді, елементом якої можна вважати активацію каталази.

Порівняння результатів, отриманих для рослин ДТ та KO-Cat2, показує, що ізоформи каталази по-різному реагують на сольовий стрес. Як встановлено нами раніше, у 5-тижневих листках рослин ДТ активні ізоформи CAT2 та CAT3, тоді як у лінії KO-Cat2 ізоформа CAT2 повністю відсутня [31]. Отже, зростання каталазної активності у листках рослин нокаутної лінії за дії 200 мМ NaCl протягом 4 год. має бути наслідком активації ізоформи CAT3, а зниження активності у рослин ДТ за дії 50 та 100 мМ NaCl – втратою активності ізоформи CAT2 (оскільки активність ізоформи CAT3 на цій стадії

стресової відповіді зростає). Проте, після 8-годинної обробки активність CAT3 у нокаутній лінії залишалась без змін. Відповідно, складається враження, що зростання каталазної активності у рослин ДТ має бути результатом відновлення активності CAT2, яка була знижена після 4-годинної дії хлориду натрію. Таким чином, відносний вклад ізоформ каталази у розщеплення  $H_2O_2$  змінюється під час розвитку стресової відповіді.

Зміни активності CAT за дії сольового стресу у ДТ та КО-*Cat2* можуть зумовлюватись диференційною транскрипцією генів, що кодуєть окремі ізоформи. На підтримку такої точки зору можна навести результати дослідження експресії ізоформ каталази рису, яке показало, що ізоформа CAT-A не експресується за 24-годинної дії 200 мМ NaCl, в той час як транскрипти CAT-B накопичуються за цих умов, а транскрипти CAT-C – лише через 48 год. [32].

Різний характер експресії ізоформ CAT ми виявляли раніше при дослідженні впливу теплового стресу на рослини ДТ та КО-*Cat2* [23]. Зокрема, за дії 2-годинного теплового стресу у лінії КО-*Cat2* виявлено зростання каталазної активності, тоді як у рослин ДТ змін активності CAT не спостерігали. Також було встановлено, що ізоформи каталази по-різному реагують на 12-годинну обробку хлоридом кадмію [31]. У цьому випадку активність ферменту знижувалась у рослин ДТ, але залишалась незмінною у лінії КО-*Cat2* при застосуванні для обробки хлориду кадмію у концентрації до 0,5 мМ. На загал ці дані свідчать, що активність ізоформ каталази диференційно змінюється за дії різних форм абіотичного стресу. Таким чином, імовірно причиною існування декількох генів, які кодуєть різні ізоформи каталази, може бути фізіологічна необхідність диференційно змінювати їхню експресію – як в онтогенезі [17], так і у відповідь на різноманітні зовнішні впливи. У такому випадку слід очікувати, що для забезпечення диференційної транскрипції членів цієї мультигенної родини у їхніх промоторах мають бути присутні різні регуля-

торні ділянки, які взаємодіють з відповідними регуляторними ланцюгами. На підтримку такої точки зору стосовно генів каталази можна навести результати порівняльного аналізу послідовностей генів *Cat*, які свідчать про підвищену швидкість молекулярної еволюції їхніх промоторних ділянок порівняно із кодувальними [33].

## **Висновки**

Отримані результати свідчать, що активація каталази є одним із елементів ранньої відповіді рослин арабідопсису на сольовий стрес. При цьому експресовані у листках ізоформи каталази по-різному активуються на різних етапах розвитку стресової відповіді. Причиною існування декількох ізоформ CAT може бути неможливість забезпечити диференційну експресію каталази у відповідь на чисельні зовнішні стимули шляхом поєднання різних регуляторних сигналів у межах одного промотора.

## **Перелік літератури**

1. Li Y., Darley C.P., Ongaro V., Fleming A., Schipper O., Baldauf S.L., McQueen-Mason S.J. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 128. – P. 854–864.
2. Arondel V., Vergnolle C., Cantrel C., Kader J.-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* – 2000. – Vol. 157, № 1. – P. 1–12.
3. Chen X., Wang M.L., Holbrook C., Culbreath A., Liang X., Brenneman T., Guo B. Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 29, № 2. – P. 389–403.
4. Grégoire C., Rémus-Borel W., Vivancos J., Labbé C., Belzile F., Bélanger R.R. Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense* // *Plant J.* – 2012. – Vol. 72, № 2. – P. 320–330.
5. Lin Y.-L., Lai Z.-X. Superoxide dismutase multigene family in longan somatic embryos: a comparison of CuZn-SOD, Fe-SOD, and Mn-SOD gene structure, splicing, phylogeny, and expression // *Mol. Breeding.* – 2013. – Vol. 32, № 3. – P. 595–615.
6. Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P.M., McPeck A., Thomas T.L., McClung C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 112. – P. 327–336.



7. *Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H.* A large family of class III plant peroxidases // *Plant Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 42. – P. 462–468.
8. *Santos M., Gousseau H., Lister C., Foyer C., Creissen G., Mullineaux P.* Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family // *Planta.* – 1996. – Vol. 198. – P. 64–69.
9. *Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – Vol. 55. – P. 373–399.
10. *Gill S.S., Tuteja N.* Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – Vol. 48. – P. 909–930.
11. *Abogadallah G.M.* Antioxidative defense under salt stress // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – Vol. 5. – P. 369–374.
12. *Yamane K., Taniguchi M., Miyak H.* Salinity-induced subcellular accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaves of rice // *Protoplasma.* – 2012. – Vol. 249. – P. 301–308.
13. *Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2000. – Vol. 57. – P. 779–795.
14. *Panchuk I., Pyrizhok R., Volkov R.* Engineering of new plants cultivars with improved abiotic stress tolerance // *Ann. Suceava Univ.* – 2007. – Vol. 6. – P. 25–35.
15. *Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F.* Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 61. – P. 733–746.
16. *Walley J.W., Dehesh K.* Molecular mechanisms regulating rapid stress signaling networks in *Arabidopsis* // *J. Integrat. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 52. – P. 354–359.
17. *Orendi G.* Expression von Katalasen waehrend der Blattseneszenz und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. / *Dissertation Verlag Grauer.* – 2001. – 135 s.
18. *Djanaguiraman M., Prasad P.V.V.* Effects of salinity on ion transport, water relations and oxidative damage // In: *Parvaiz Ahmad, M.M. Azooz, M.N.V. Prasad (eds.). Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress.* – Springer: New York, 2013. – P. 89–114.
19. *Mhamdi A., Noctor G., Baker A.* Plant catalases: Peroxisomal redox guardians // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol. 525. – P. 181–194.
20. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analyt. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
21. *Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І.* Метод визначення каталазної активності у рослинному матеріалі // *Физиол. биохим. культурних рослин.* – 2010. – Т. 42, № 6. – С. 497–503.
22. *Буджак В.В.* Біометрія. – Чернівці: Рута, 2013. – 326 с.
23. *Буздуга І.М., Волков Р.А., Панчук І.І.* Роль ізоформи каталази CAT2 у ранній відповіді *Arabidopsis thaliana* на тепловий стрес // *Вісник УТГіС.* – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 12–19.
24. *Molazem D., Azimi J., Branch A.* Proline reaction, peroxide activity and antioxidant enzymes in varieties of maize (*Zea mays* L.) under different levels of salinity // *Australian J. Basic Appl. Sci.* – 2011. – Vol. 5, № 10. – P. 1248–1253.
25. *Sneha S., Rishi A., Chandra S.* Effect of short term salt stress on chlorophyll content, protein and activities of catalase and ascorbate peroxidase enzymes in Pearl Millet // *Am. J. Plant Physiol.* – 2014. – Vol. 9, Iss. 1. – P. 32–37.
26. *Zamani S., Nezami M.T., Bybordi A., Behdad M., Khorshidi M.B.* Effect of different NaCl salinity on antioxidant enzyme activity and relative water in winter canola (*Brassica napus*) // *J. Res. Agricult. Sci.* – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 49–57.
27. *Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53, № 372. – P. 1237–1247.
28. *Vaidyanathan H., Sivakumar P., Chakrabarty R., Thomas G.* Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties // *Plant Sci.* – 2003. – Vol. 165. – P. 1411–1418.
29. *Yamane K., Mitsuya S., Taniguchi M., Miyake H.* Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf // *Plant Prod Sci.* – 2009. – Vol. 12. – P. 319–326.
30. *Rajaravindran M., Natarajan S.* Effects of salinity stress on growth and antioxidant enzymes of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* // *Int. J. Res. Plant Sci.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 23–28.
31. *Доліба 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. – Т. 9, № 2. – С. 200–208.
32. *Yamane K., Mitsuya S., Taniguchi M., Miyake H.* Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity // *Plant Prod. Sci.* – 2010. – Vol. 13, № 2. – P. 164–168.
33. *Діденко Н.О., Тинкевич Ю.О., Волков Р.А., Панчук І.І.* Клонування кДНК ізоформи каталази *Cat2 Arabidopsis thaliana* з використанням двоетапної ПЛР // *Вісник УТГіС.* – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 7–13.

Представлено О.М. Тищенко  
Надійшла 03.11.2014

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ИЗОФОРМ КАТАЛАЗЫ *ARABIDOPSIS THALIANA*  
НА В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА**

*И.Н. Буздуга, Н.А. Диденко, Р.А. Волков,  
И.И. Панчук*

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

**Цель.** Причины широкого распространения мультигенных семейств в геномах растений выяснены все еще недостаточно. **Целью** исследования было установить специфическую роль изоформ каталазы в ранней ответной реакции растений *Arabidopsis thaliana* на солевой стресс. **Методы.** Розетки растений дикого типа и гомозиготной нокаутной линии KO-*Cat2* (SALK 057998), мутантной по гену каталазы *Cat2*, подвергали воздействию 50, 100 та 200 мМ NaCl в течение 4 и 8 часов. Оценивались изменения активности каталазы. **Результаты.** Установлено, что общая каталазная активность в листьях KO-*Cat2* нокаутных растений была приблизительно вдвое ниже, чем у растений дикого типа. Под воздействием солевого стресса активность CAT в листьях дикого типа снижалась при 4-часовой обработке 50 и 100 мМ NaCl и оставалась на уровне контроля в присутствии 200 мМ NaCl. Продление времени обработки до 8 часов сопровождалось возрастанием каталазной активности. У нокаутной линии KO-*Cat2* активность CAT возрастала выше контрольного уровня при 4-часовом воздействии 200 мМ NaCl и оставалась неизменной во всех остальных вариантах опыта. **Выводы.** Активация каталазы является одним из элементов раннего ответа растений *Arabidopsis thaliana* на солевой стресс. Изоформы каталазы по-разному активируются на разных этапах развития стрессового ответа. Причиной существования нескольких изоформ CAT может быть невозможность объединить в пределах одного промотора различные регуляторные сигналы, необходимые для обеспечения дифференциальной экспрессии этого фермента в ответ на многочисленные внешние стимулы.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, мультигенные семейства, изоформы каталазы, перекись водорода, солевой стресс, нокаутные мутанты.

**DIFFERENTIAL ACTIVITY OF CATALASE  
ISOFORMS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*  
UPON SALT STRESS**

*I.M. Buzduga, N.O. Didenko, R.A. Volkov,  
I.I. Panchuk*

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

**Aim.** The reasons for the broad distribution of multigene families in plant genomes are poorly understood to date. The aim of the current work was to investigate the specific roles of catalase isoforms during early response of *Arabidopsis thaliana* to salt stress. **Methods.** Rosettes of wild-type and *Catalase 2* knock-out plants (KO-*Cat2* homozygote knock-out strain SALK 057998) were treated with 50, 100 or 200 mM NaCl for 4 or 8 hours. Afterwards, catalase activity changes were evaluated. **Results.** It was found that the total catalase activity in KO-*Cat2* leaves was about twofold lower than in wild-type. The activity of catalase in wild-type leaves decreased under 4-hour treatment with 50 and 100 mM NaCl and remained at control level during 200 mM NaCl treatment. Extending the treatment time to 8 hours resulted in elevation of catalase activity. In the KO-*Cat2* plants the catalase activity increased above control levels while treated with 200 mM NaCl and remained unchanged in all other treatments. **Conclusions.** The activation of catalase is one of the early responses of *Arabidopsis thaliana* to salt stress. Isoforms of catalase are activated differently during the stages of stress response. A possible reason for the existence of several isoforms of CAT appears to be the impossibility to combine different regulatory signals, which are required for differential expression of this enzyme in response to various external factors, within one single promoter.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, multigenic families, catalase isoforms, hydrogen peroxide, salt stress, knock-out mutants.