

УДК 577.152.1 + 577.151.04 + 577.25

**ВПЛИВ ХЛОРИДУ НАТРІЮ НА АКТИВНІСТЬ  
ДЕГІДРОАСКОРБАТРЕДУКТАЗИ  
У НОКАУТНОГО ПО КАТАЛАЗІ 2  
МУТАНТУ *ARABIDOPSIS THALIANA***

І. М. БУЗДУГА, Р. А. ВОЛКОВ, І. І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,  
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012  
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

**Мета.** Для кращого розуміння механізмів стійкості рослин до абіотичного стресу важливо з'ясувати, яку роль у відповіді на стрес відіграють окремі антиоксидантні ферменти, що належать до однієї мультипротеїнової родини. Відомо, що втрата певних ізоформ антиоксидантних ферментів може бути компенсована за рахунок зростання активності інших ферментів. Проте функціональна взаємодія ферментів аскорбат-глутатіонового циклу з каталазою за умов сольового стресу все ще не досліджена. Тому нами було вивчено активність DHAR у нокаутних по каталазі мутантів *Arabidopsis thaliana* в умовах сольового стресу. **Методи.** У нокаутній лінії *cat2* та у рослин арабідопсису дикого типу (ДТ) визначали активність DHAR за різних варіантів обробки хлоридом натрію. **Результати.** При проведенні обробки 200 мМ хлоридом натрію у темряві активація DHAR у рослин ДТ спостерігається через 8 год, а у нокаутній лінії *cat2* — вже через 4 год. Проте, при проведенні стресової обробки при освітленні у обох досліджених ліній виявлено суттєве підвищення активності DHAR через 8 год. При цьому активність DHAR у *cat2* виявилась нижче, ніж у ДТ, тоді як у інтактних рослин або при проведенні стресової обробки у темряві різниця між досліджуваними лініями відсутня. **Висновки.** Отримані дані свідчать, що за умов сольового стресу зміни в активності DHAR є частиною функціональних перебудов антиоксидантної системи у лінії *cat2*, які компенсують втрату активності ізоформи CAT2.

**Ключові слова:** дегідроаскорбатредуктаза (DHAR), каталаза, нокаутні рослини, активні форми кисню (АФК), сольовий стрес, *Arabidopsis thaliana*.

**Вступ.** Засолення ґрунтів є однією з основних причин, що обмежують продуктивність сільськогосподарських культур. Перспективним шляхом вирішення цієї проблеми вважається підвищення толерантності рослин до сольового стресу, базуючись на розумінні механізмів клітинної відповіді, в основі якої лежать зміни експресії стресових генів та активності кодованих ними білків [1].

Для рослин характерна наявність у геномі мультигенних родин. Важливим є з'ясування ролі у відповіді рослин на дію абіотичного стресу окремих членів мультигенних родин, які кодують стресові білки, напр., ферменти антиоксидантної системи. Серед таких ферментів важливе місце посідає каталаза (CAT). У переважній більшості рослин цей фермент кодується трьома генами, експресія яких змінюється в залежності від стадії розвитку або дії зовнішніх чинників [2]. CAT відіграє важливу роль у захисті від дії абіотичних стресових факторів (засолення, посуха, екстремальні температури, надмірне освітлення, тощо), які викликають зростання вмісту пероксиду водню у рослинній клітині [3]. Проте, регуляція активності CAT та її взаємодія із іншими антиоксидантними ферментами все ще залишаються не повністю з'ясованими. Зручною моделлю для таких досліджень є нокаутні лінії рослин із втраченою (зниженою) активністю CAT. Раніше нами було показано, що у *Arabidopsis thaliana* втрата окремих ізоформ CAT може компенсуватись активацією інших ферментів, зокрема аскорбат пероксидази (APX), яка входить до складу аскорбат-глутатіонового циклу [3].

Проте досі не з'ясовано, чи інші ферменти цього циклу беруть участь у такій метаболічній компенсації. Зокрема, характер їх функціональної взаємодії з CAT за умов сольового стресу все ще не досліджено.

Одним з ферментів аскорбат-глутатионовому циклу є дегідроаскорбатредуктаза (DHAR). Цей фермент відіграє важливу роль в регуляції окислювально-відновного стану аскорбату (As) в рослинній клітині, перетворюючи його окислену форму (дегідроаскорбат, DHA) до відновленої з використанням глутатіону в якості субстрату [4]. Виявлено, що надекспресія генів DHAR зумовлює збільшення пулу відновленого As [5–7]. Встановлено, що DHAR має важливе значення у захисті рослин за дії абіотичних стресових факторів, зокрема посухи, підвищених температур, надмірного освітлення, засолення, дії озону, важких металів, тощо [4–9]

Отже, DHAR є ключовим ферментом, який бере участь у підтримці пулу відновленого As і відіграє важливу роль у клітинній відповіді рослин за дії стресових факторів. Проте, роль цього ферменту та його функціональна взаємодія із іншими елементами антиоксидантної системи, зокрема — CAT, на ранніх етапах відповіді на підвищення концентрації хлориду натрію не з'ясована. Тому метою даної роботи було дослідити вплив короткотривалого гострого сольового стресу на активність DHAR у нокаутній по ізоформі CAT2 лінії *A. thaliana*.

#### **Об'єкти та методи дослідження**

Для дослідження впливу хлориду натрію використовували 5 тижневі рослини *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia 0 (дикий тип, ДТ) та нокаутної лінії *cat2*, у якої внаслідок інсерції Т-ДНК втрачена експресія гена *Cat-2*. Рослини вирощували в культивативній кімнаті за сталої температури 20 °С 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 (0,5x MS), яке додатково містило хлорид натрію

у концентраціях 50, 100 та 200 мМ. Зразки інкубували на світлі або в темряві за температури 20 °С протягом 4 та 8 годин. Концентрацію хлориду натрію та час обробки підбирали у попередніх експериментах. Контрольні рослини інкубували на середовищі 0,5x MS без додавання хлориду натрію. У якості додаткового контролю використовували інтактні рослини, які заморожували у рідкому азоті безпосередньо після зрізання.

Для вимірювання активності ферменту готували екстракт нативних білків. Для цього заморожений рослинний матеріал гомогенізували з рідким азотом. Для екстракції білків у нативному стані використовували буфер, який складався із 50 мМ трис-НСІ (рН = 7,4), 100 мМ хлориду натрію, 2 мМ ЕДТА. 150 мг гомогенізованого рослинного матеріалу переносили у мікроцентрифужну пробірку та додавали 450 мкл охолодженого екстракційного буферу. Вміст проб ретельно перемішували та центрифугували на центрифугу Eppendorf Centrifuge 5415C при +4 °С та 15000 g протягом 15 хв. Отриманий супернатант переносили у чисту мікропробірку та зберігали на льоду для подальшого визначення активності ферменту.

Залізну активність DHAR визначали спектрофотометрично за методом, описаним в літературі із незначними модифікаціями [10]. Для цього у контрольну кювету додавали 1,0 мл реакційної суміші, що містила 50 мМ К-фосфатного буферу (рН = 7,0), 2 мМ відновленого глутатіону, 0,2 мМ DHA. У дослідну кювету, відповідно, додавали 890 мкл реакційного буферу та окремо вносили 100 мкл свіжоприготовленого 2 мМ DHA і 10 мкл білкового екстракту. Вимірювання зміни оптичної густини проби проводили за довжини хвилі 265 нм на спектрофотометрі СФ-46. Активність ферменту вираховували як зміну концентрації аскорбату (в мкмольях) за 1 хвилину в перерахунку на 1 мг білка. Кількість білка в екстракті визначали за методом Бредфорда [11].

Всі експерименти було повторено для чотирьох незалежно вирощених партій рослин. Кожне вимірювання проводили у трьох паралельних пробах. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [12].

#### **Результати та обговорення**

На першому етапі нашої роботи було вивчено вплив різних концентрацій хлориду на-

трію на активність DHAR при проведенні стресової обробки в темряві. Такий експериментальний підхід дає можливість уникнути додаткового утворення АФК у тканинах листків *A. thaliana* при фотосинтезі.

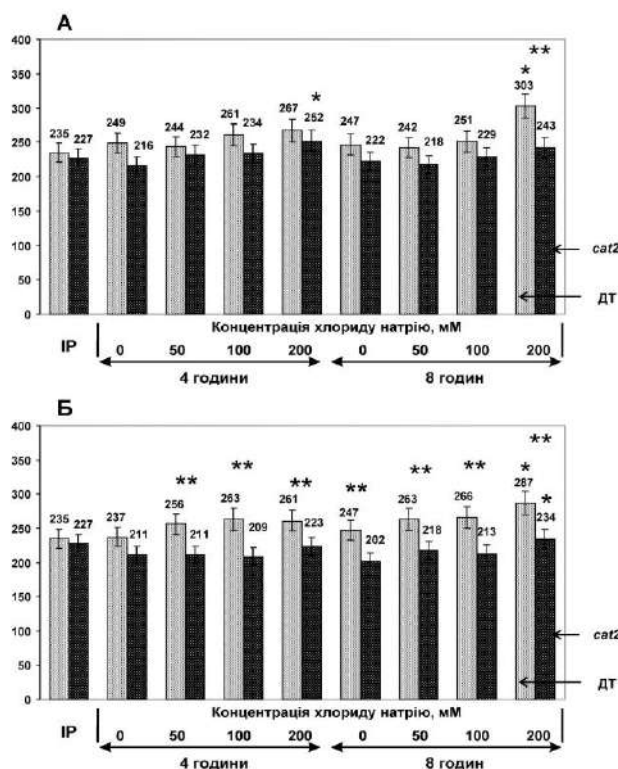
В результаті проведених досліджень виявлено, що у інтактних рослин ДТ та нокаутної *cat2* лінії активність DHAR не відрізнялась (рис. 1А).

Сольовий стрес викликав зміни активності DHAR у досліджуваних лініях рослин. Так, після 4-годинної стресової обробки в темряві різними концентраціями хлориду натрію у нокаутних *cat2* рослин виявлено зростання активності DHAR на 16 % за дії найвищої концентрації 200 мМ. В той же час, у рослин ДТ не виявлено достовірних змін активності ферменту порівняно з контрольними значеннями. При збільшенні тривалості стресової обробки до 8 годин у рослин ДТ спостерігалось зростання активності DHAR за дії 200 мМ хлориду натрію на 23 % порівняно з контролем. У нокаутних рослин за цих умов не відбувалось жодних змін. Отже, отримані дані свідчать, що відповідь на дію

стресу у нокаутних рослин спостерігається раніше, ніж у ДТ.

При освітленні відбувається світлозалежна генерація АФК, які, зокрема, можуть слугувати сигнальними молекулами для активації клітинної відповіді у рослин. Відповідно, наступний етап наших досліджень полягав у визначенні активності DHAR в листках нокаутних *cat2* рослин *A. thaliana*, які зазнавали дії різних концентрацій хлориду натрію протягом 4 та 8 годин в умовах освітлення.

Характер змін активності DHAR при проведенні стресової обробки на світлі був іншим, ніж у темряві. Так, після 4-х годинної обробки не спостерігалось змін активності ферменту ані у ДТ, ані у нокаутної лінії *cat2*. Проте, збільшення тривалості стресової обробки при освітленні до 8 годин супроводжувалось зростанням активності DHAR у обох досліджуваних лініях. Це збільшення активності спостерігалось лише за дії найвищої використаної нами концентрації хлориду натрію та складало 16 % порівняно з контрольними рослинами.



**Рисунок 1.** Активність DHAR у листках *Arabidopsis thaliana* ДТ та нокаутної *cat2* лінії за дії різних концентрацій хлориду натрію протягом 4 та 8 годин. IP — інтактні рослини. А — темрява; Б — світло. **Примітка.** \* — різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна ( $P < 0,05$ ); \*\* — різниця між ДТ та лінією *cat2* достовірна.

Порівняння даних, отриманих для двох досліджуваних ліній показало, що при проведенні стресової обробки при освітленні активність DHAR у рослин лінії *cat2* є на 15–21 % нижчою, ніж у ДТ, тоді як при проведенні обробки у темряві різниці між лініями не спостерігалось (рис. 1).

Відомо, що підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів натрію є токсичним для рослинних організмів [13]. Ці іони є причиною перерозподілу інших іонів у цитоплазмі, що, зокрема, призводить до порушення структури мембран, сповільнення фотосинтезу та підсилення утворення активних форм кисню (АФК), які здатні окислювати ДНК, білки та ліпіди мембран [14, 15]. Інше кажучи, високі концентрації солей, зокрема NaCl, поряд з іонним дисбалансом і гіперосмотичним стресом викликають оксидативний стрес, який в свою чергу індукує у рослинній клітині захисну відповідь [16, 17].

Отримані нами дані свідчать, що елементом відповіді рослин арабідопсису на гострий сольовий стрес є активація антиоксидантного ферменту DHAR у листах. При цьому для розвитку стресової відповіді та індукції захисних механізмів рослинної клітини необхідний певний час. Зокрема, при застосуванні для стресової обробки 200 мМ хлориду натрію у темряві активація DHAR спостерігалась у рослин лінії *cat2* через 4 год, а у ДТ — через 8 год. Цей висновок добре узгоджується із даними, отриманими нами раніше, де показано, що за таких самих умов обробки зростання активності іншого ферменту антиоксидантного захисту, гваяколпероксидази (POD) у лінії *cat2* та у ДТ спостерігалось через 4 та 8 год, відповідно [18].

Раніше нами було досліджено вплив гострого сольового стресу на вміст тіобарбітурат-активних продуктів (ТБКАП), які є маркером перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у рослин. Показано, що у рослин *A. thaliana* ДТ та *cat2* відбувається зниження вмісту ТБКАП в присутності 200 мМ хлориду натрію як за умов проведення стресової обробки на світлі, так і в умовах темряви [19]. Наші нові дані свідчать, що таке зниження вмісту ТБКАП може бути наслідком активації DHAR.

Аналогічні результати щодо зростання активності DHAR та зниження вмісту ТБКАП виявлено і для рису [5, 9, 20, 21]. Зокрема, показано, що у трансгенних рослин *Oryza sativa* з підвищеною експресією гену *OsDHAR1* за дії 100 мМ хлориду натрію протягом 28 денної обробки виявлено зростання активності DHAR у 2 рази, порівняно з контролем. Окрім цього, активність інших антиоксидантних ферментів — APX, глута-

тійон редуктази та монодегідроаскорбат редуктази — зростала у 1,5 рази, тоді як вміст пероксиду водню та інтенсивність ПОЛ, навпаки, знижувалися у 1,4 рази. Автори припускають, що надекспресія *OsDHAR1* підвищує адаптацію рослин рису до сольового стресу, підтримуючи пул As та клітинний редокс-гомеостаз в цілому [9].

Подібні результати були отримані при дослідженні клітинної відповіді рослин *A. thaliana* за дії теплового стресу та інтенсивного освітлення [7]. Виявлено, що у 18-денних рослинах арабідопсису із надекспресією генів DHAR активність ферменту була у тричі більша, ніж у рослин дикого типу. Це в свою чергу призводило до 3,3-кратного збільшення рівня As і, відповідно, зниження рівня DHA на 60 %, що призводило до збільшення співвідношення As/DHA у листках трансгенних рослин. Крім того, трансгенні рослини також демонстрували 2,7-кратне збільшення рівня відновленого глутатіону. Також було встановлено, що збільшення вмісту As у трансгенних рослин з надекспресією генів DHAR збільшує їх стійкість до оксидативного стресу.

Іншими авторами було доведено важливу роль окремих генів DHAR у рослин *A. thaliana* за дії фотооксидативного стресу [5, 20]. Так, нокаутні рослини арабідопсису з порушеною експресією генів *Dhar1*, *Dhar2* або *Dhar3* характеризувались зниженою активністю цього ферменту, зниженим вмістом As, зростанням концентрації пероксиду водню та інтенсивності ПОЛ.

Важливим компонентом антиоксидантної системи рослин є CAT, яка серед іншого приймає участь у захисті рослин від сольового стресу [22]. Раніше було встановлено, що залежно від умов культивування та стресової обробки суттєве зниження активності CAT у нокаутній лінії *cat-2* *A. thaliana* частково компенсується активацією пероксидаз (APX та POD), ізоформи CAT3 [23], а також — збільшенням пулу глутатіону [24, 25]. Наші нові дані свідчать, що перебудови у роботі антиоксидантної системи у нокаутній лінії *cat2* також стосуються змін у активності DHAR, зокрема — за умов сольового стресу. Так, (а) за дії 200 мМ хлориду натрію у темряві зростання активності DHAR у лінії *cat2* відбувається вже після 4 год стресової обробки проти 8 год у рослин ДТ; (б) за дії сольового стресу при освітленні активність DHAR у *cat2* нижче, ніж у ДТ. Останнє спостереження може вказувати на те, що у лінії *cat2* підтримання пулу As може більшою мірою, ніж у ДТ відбуватись незалежним від DHAR шляхом, напр., завдяки активації монодегідроаскорбат редуктази або ферредоксинів у хлоропластах [26, 27]. Останнє може бути необхідним для

підтримання характерного для *cat2* збільшеного пулу глутатіону. Тобто, збільшення активності DHAR у *cat2* в умовах сольового стресу може бути небажаним, оскільки призведе до зниження вмісту відновленого глутатіону. Перевірка цієї гіпотези потребує подальших досліджень.

**Висновки.** Отримані дані свідчать, що елементом відповіді рослин арабідопсису на гострий сольовий стрес є активація DHAR у листах. При проведенні стресової обробки 200 мМ хлоридом натрію у темряві активація DHAR у рослин ДТ спостерігається через 8 год, а у нокаутної лінії *A. thaliana cat2* — вже через 4 год. Проте, при проведенні стресової обробки при освітленні у обох досліджених ліній виявлено суттєве підвищення активності DHAR через 8 год. При цьому активність DHAR у *cat2* виявилась нижче, ніж у ДТ, тоді як у інтактних рослин або при проведенні стресової обробки у темряві різниця між досліджуваними лініями відсутня.

#### Перелік літератури

- Gollack D., Li C., Mohan H., Probst N. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5, No 151. P. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2014.00151.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 2010. Vol. 61, No 15. P. 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282.
- Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 48, No 12. P. 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gallie D. R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*. 2013. Vol. 64, No 2. P. 433–443. doi: 10.1093/jxb/ers330.
- Noshi M., Yamada H., Hatanaka R., Tanabe N., Tamoi M., Shigeoka S. Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016. Vol. 1. P. 1–11. doi: 10.1080/09168451.2016.1256759.
- Yin L., Wang S., Eltayeb A. E., Uddin M. I., Yamamoto Y., Tsuji W., Takeuchi Y., Tanaka K. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta*. 2010. Vol. 231. P. 609–621. doi: 10.1007/s00425-009-1075-3.
- Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L. Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010. Vol. 52. P. 400–409. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x.
- Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang H., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of Fe-SOD, MDHAR, DHAR genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments. *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 20939–20954. doi: 10.3390/molecules201119741.
- Kim Y. S., Kim I. S., Shin S. Y., Park T. H., Park H. M., Kim Y. H., Lee G. S., Kang H. G., Lee S. H., Yoon H. S. Overexpression of dehydroascorbate reductase confers enhanced tolerance to salt stress in rice plants (*Oryza sativa* L. japonica). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2014. P. 1–13. doi: 10.1111/jac.12078.
- Hossain M. A., Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology*. 1984. Vol. 25, No 1. P. 85–92. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Буджак В. В. Біометрія. Чернівці: Пута, 2013. 326 с. ISBN 978-966-423-312-2.
- Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*. 2014. Vol. 14. P. 1–18. doi: 10.1155/2014/70159d.
- Abbaspour H. Effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and proline accumulation in pistachio plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012. Vol. 6, No 3. P. 526–529.
- Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. 2014. Vol. 2. P. 1–13. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.
- Agarwal P. K., Shukla P. S., Gupta K., Jha B. Bio-engineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular Biotechnology*. 2013. Vol. 54. P. 102–123. doi: 10.1007/s12033-012-9538-3.
- Sazzad M., Dietz K.-J. Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7, No 548. P. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2016.00548.
- Діденко Н. О., Буздуга І. М., Волков Р. А., Панчук І. І. Активність аскорбат та гваякол пероксидаз у нокаутного мутанта *cat2* *Arabidopsis thaliana* за дії сольового стресу. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2015. Т. 13, № 1. С. 34–38.
- Діденко Н. А., Буздуга І. Н., Волков Р. А., Панчук І. І. Влияние острого солевого стресса на перекисное окисление липидов у *Arabidopsis thaliana*. *Buletin științific Chișinău*. 2015. Т. 22. P. 16–20.
- Noshi M., Hatanaka R., Tanabe N., Terai Y., Maruta T., Shigeoka S. Redox regulation of ascorbate

and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in Arabidopsis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015. Vol. 1. P. 1–7. doi: 10.1080/09168451.2015.1135042.

21. Rahman A., Hossain M. S., Mahmud J. A., Nahar K., Hasanuzzaman M., Fujita M. Manganese-induced salt stress tolerance in rice seedlings: regulation of ion homeostasis, antioxidant defense and glyoxalase systems. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2016. Vol. 22, No 3. P. 291–306. doi: 10.1007/s12298-016-0371-1.
22. Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, No 6. P. 13561–13578. doi: 10.3390/ijms160613561.
23. Буздуга І. М., Волков Р. А., Панчук І. І. Метаболічна компенсація у мутантів *Arabidopsis thaliana* із втраченою активністю каталази. *Цитологія і генетика*. 2018. Т. 52, No 1. С. 41–51.
24. Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoerberichts F. A., Vandoorpe M., Gakiere B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F., Noctor G. Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *The Plant Journal*. 2007. Vol. 52, No 4. P. 640–657. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03263.x.
25. Gao X., Yuan H. M., Hu Y. Q., Li J., Lu Y. T. Mutation of Arabidopsis CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant, Cell and Environment*. 2014. Vol. 37, No 1. P. 175–188. doi: 10.1111/pce.12144.
26. Sudan J., Negi B., Arora S. Oxidative stress induced expression of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015. Vol. 21, No 4. P. 551–558. doi: 10.1007/s12298-015-0327-x.
27. Balsera M., Schuermann P., Buchanan B. Redox regulation in chloroplasts. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Eds. H. Kirchoff. Caister Academic Press, 2016. 290 p. ISBN: 978-1-910190-47-0.

## References

1. Gollmack D., Li C., Mohan H., Probst N. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5, No 151. P. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2014.00151.
2. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 2010. Vol. 61, No 15. P. 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282.
3. Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*.

2010. Vol. 48, No 12. P. 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

4. Gallie D. R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*. 2013. Vol. 64, No 2. P. 433–443. doi: 10.1093/jxb/ers330.
5. Noshi M., Yamada H., Hatanaka R., Tanabe N., Tamoi M., Shigeoka S. Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016. Vol. 1. P. 1–11. doi: 10.1080/09168451.2016.1256759.
6. Yin L., Wang S., Eltayeb A. E., Uddin M. I., Yamamoto Y., Tsuji W., Takeuchi Y., Tanaka K. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta*. 2010. Vol. 231. P. 609–621. doi: 10.1007/s00425-009-1075-3.
7. Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L. Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2010. Vol. 52. P. 400–409. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x.
8. Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang H., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of Fe-SOD, MDHAR, DHAR genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments. *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 20939–20954. doi: 10.3390/molecules201119741.
9. Kim Y. S., Kim I. S., Shin S. Y., Park T. H., Park H. M., Kim Y. H., Lee G. S., Kang H. G., Lee S. H., Yoon H. S. Overexpression of dehydroascorbate reductase confers enhanced tolerance to salt stress in rice plants (*Oryza sativa* L. japonica). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2014. P. 1–13. doi: 10.1111/jac.12078.
10. Hossain M. A., Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology*. 1984. Vol. 25, No 1. P. 85–92. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
12. Budhzak V. V. *Biometrics*. Chernivtsi: Ruta, 2013. 326 p. ISBN 978-966-423-312-2.
13. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*. 2014. Vol. 14. P. 1–18. doi: 10.1155/2014/70159d.
14. Abbaspour H. Effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and proline accumulation in pistachio plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012. Vol. 6, No 3. P. 526–529.
15. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants.

- Frontiers in Environmental Science. 2014. Vol. 2. P. 1–13. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.
16. Agarwal P. K., Shukla P. S., Gupta K., Jha B. Bio-engineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular Biotechnology*. 2013. Vol. 54. P. 102–123. doi: 10.1007/s12033-012-9538-3.
  17. Sazzad M., Dietz K.-J. Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7, No 548. P. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2016.00548.
  18. Didenko N. O., Buzduga I. M., Volkov R. A., Panchuk I. I. Activity of ascorbate and guaiacol peroxidases in *Arabidopsis thaliana* cat2 knockout mutants under salt stress. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2015. Vol. 13, No 1. P. 34–38.
  19. Didenko N. A., Buzduga I. N., Volkov R. A., Panchuk I. I. The influence of acute salt stress on lipid peroxidation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Bulletin Chişinău*. 2015. Vol. 22. P. 16–20.
  20. Noshi M., Hatanaka R., Tanabe N., Terai Y., Maruta T., Shigeoka S. Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015. Vol. 1. P. 1–7. doi: 10.1080/09168451.2015.1135042.
  21. Rahman A., Hossain M. S., Mahmud J. A., Nahar K., Hasanuzzaman M., Fujita M. Manganese-induced salt stress tolerance in rice seedlings: regulation of ion homeostasis, antioxidant defense and glyoxalase systems. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2016. Vol. 22, No 3. P. 291–306. doi: 10.1007/s12298-016-0371-1.
  22. Sofo A., Scopa A., Nuzzaci M., Vitti A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, No 6. P. 13561–13578. doi: 10.3390/ijms160613561.
  23. Buzduga I. M., Volkov R. A., Panchuk I. I. Metabolic compensation for *Arabidopsis thaliana* mutants with loss of catalase activity. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52, No 1. P. 41–51.
  24. Queval G., Issakidis-Bourquet E., Hoeberichts F. A., Vandorpe M., Gakiere B., Vanacker H., Miginiac-Maslow M., Van Breusegem F., Noctor G. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *The Plant Journal*. 2007. Vol. 52, No 4. P. 640–657. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03263.x.
  25. Gao X., Yuan H. M., Hu Y. Q., Li J., Lu Y. T. Mutation of *Arabidopsis* CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant, Cell and Environment*. 2014. Vol. 37, No 1. P. 175–188. doi: 10.1111/pce.12144.
  26. Sudan J., Negi B., Arora S. Oxidative stress induced expression of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015. Vol. 21, No 4. P. 551–558. doi: 10.1007/s12298-015-0327-x.
  27. Balsera M., Schuermann P., Buchanan B. Redox regulation in chloroplasts. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Eds. H. Kirchhoff. Caister Academic Press, 2016. 290 p. ISBN: 978-1-910190-47-0.

Представлено І. А. Козерецькою  
Надійшла 02.10.2017

### INFLUENCE OF SODIUM CHLORIDE ON THE DEHYDROASCORBATE REDUCTASE ACTIVITY IN *ARABIDOPSIS THALIANA* CATALASE 2 KNOCKOUT MUTANT

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

Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Yuri Fedkovych University of Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2, 58012, Chernivtsi, Ukraine  
e-mail for correspondence: i.panchuk@chnu.edu.ua

**Aim.** To better understand the mechanisms of abiotic stress resistance in plants, it is important to clarify the role of individual antioxidant enzymes from the same multiprotein family in the response to stress. It is known that the loss of some isoforms of antioxidant enzymes can be compensated by activation of other enzymes. However, the functional interaction of the ascorbate-glutathione cycle enzymes with catalase under salt stress still remains unexplored. Respectively, we determined the activity of DHAR in knock-out mutants of *Arabidopsis thaliana* under salt stress. **Methods.** The DHAR activity was determined in the knock-out line *cat2* and in wild-type (WT) *Arabidopsis* plants after various regimes of treatment with sodium chloride. **Results.** After treatment with 200 mM sodium chloride in the dark, activation of DHAR was found after 8 hours in WT plants and after 4 hours in the knock-out line *cat2*. However stress treatment under illumination resulted in significant increase in DHAR activity after 8 hours in both studied lines. In this case, DHAR activity in *cat2* was lower than in WT, whereas in non-treated plants or upon stress treatment in the dark no difference between the tested lines was detected. **Conclusions.** The obtained data indicate that under salt stress conditions, changes in the DHAR activity are included into functional rearrangements of the antioxidant system in *cat2* line, which compensate the loss of activity of CAT2 isoenzyme.

**Keywords:** dehydroascorbate reductase, antioxidants, reactive oxygen species (ROS), salt stress, *Arabidopsis thaliana*.