

УДК 577.218 + 577.151.042:577.152.193

АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТ ТА ГВАЯКОЛ ПЕРОКСИДАЗ У НОКАУТНОГО МУТАНТА *CAT2 ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

Н.О. ДІДЕНКО, І.М. БУЗДУГА, 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: i.panchuk@chnu.edu.ua

Мета. Стресові білки рослин, як правило, кодуються мультигенними родинами. Проте специфічна роль окремих ізоферментів все ще залишається далекою від повного розуміння. Для того, щоб з'ясувати, як втрата окремих ізоформ каталази позначається на роботі інших ферментів, які розщеплюють пероксид водню – АРХ та POD – була зіставлена реакція на сольовий стрес рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) та нокаутного мутанта по гену *Cat2*. **Методи.** Вимірювалися активності аскорбат та гваякол пероксидаз при різних варіантах обробки рослин хлоридом натрію. **Результати.** Встановлено, що за дії сольового стресу активність POD у листках рослин ДТ зростала після 8-ми годинної обробки, а лінії *cat2* – 4-х годинної. Активність АРХ у рослин ДТ знижувалась після обробки 200 мМ розчином хлориду натрію протягом 8-ми годин, але залишалась без змін у лінії *cat2*. **Висновки.** Зниження каталазної активності у листках нокаутної мутантної лінії арабідопсису із втраченою експресією ізоформи *CAT2* призводить до змін у функціонуванні антиоксидантної системи (зокрема – до змін у активності пероксидаз) та прискорення розвитку стресової відповіді за дії сольового стресу.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, мультигенні родини, нокаутні мутанти, аскорбат та гваякол пероксидази, каталаза, ізоферменти, хлорид натрію.

Вступ. Наявність мультигенних родин у геномі є специфічною особливістю рослин [1, 2]. Це може пояснюватись тим, що окремі ізоформи таких білків виконують свою функцію у різних клітинних компартментах та/або за різних фізіологічних умов. Зокрема, мультигенними родинами кодується значна кількість стресових білків, причиною чого може бути необхідність диференційної експресії певних генів за стресових умов. Проте роль окремих ізоформ стресових білків та їхнє місце у клітинній стресовій відповіді все ще залишається з'ясованою лише фрагментарно. Подальший прогрес у розв'язанні цього питання може бути досягнутий шляхом використання як моделі для таких досліджень нокаутних рослин із втраченою активністю окремих ізоформ стресових білків.

Різні форми абіотичного стресу (екстремальні температури, посуха, засолення ґрунтів, надмірна інсоляція, токсикація іонами важких металів тощо) пов'язані з надлишковою генерацією у клітинах активних форм кисню (АФК) [3]. Встановлено, що захисна реакція клітини на таке зростання концентрації АФК охоплює активацію антиоксидантних ферментів, зокрема – каталази та пероксидаз, які розщеплюють пероксид водню [4–6]. Відповідно, втрата активності цих ферментів має призводити до зниження стійкості рослин до стресу або ж компенсуватись активацією альтернативних захисних механізмів. Зокрема, у нокаутного мутанта арабідопсису за геном *Cat2* нами встановлено перебудову ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи, яка забезпечує компенсацію зниженої активності каталази як за оптимальних умов вирощування, так і за дії теплового стресу та стресу, спричиненого надмірним накопиченням іонів міді та кадмію [7–9]. Проте досі недослідженою залишається реорганізація антиоксидантного захисту у цього мутанта за умов сольового стресу, хоча в

© Н.О. ДІДЕНКО, І.М. БУЗДУГА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК, 2015

літературі наявні вказівки на участь каталази у захисній відповіді на зростання концентрації хлориду натрію та інших солей [10–12].

У представленій роботі досліджено роль антиоксидантних ферментів, а саме – зміни активності аскорбат та гваякол пероксидаз, APX та POD, у нокаутної мутантної лінії *cat2* на ранніх етапах відповіді на сольовий стрес, спричинений швидким зростанням концентрації хлориду натрію в тканинах листка.

Матеріали і методи

Для дослідження впливу хлориду натрію використовували 5-тижневі рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. дикого типу (ДТ: екотип Columbia 0) та нокаутну лінію *cat2* з відсутньою ізоформою каталази CAT2. Рослини вирощували в культивативній 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 (0,5x MS), що додатково містило хлорид натрію у концентраціях 50, 100 та 200 мМ. Після цього зразки інкубували у темряві за температури 20°C протягом 4-х та 8-ми годин. Концентрацію хлориду натрію та час обробки підбирали у попередніх експериментах. Контрольні рослини інкубували на середовищі 0,5x MS 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.

Для вимірювання активностей ферментів отримували екстракт легкорозчинних білків. Для цього заморожений рослинний матеріал гомогенізували у ступці з рідким азотом. Для екстракції білків використовували буфер, що складався із 50 мМ натрій-фосфату (рН=7,0), 0,25 мМ ЕДТА, 10 % гліцеролу, 2 % полівінілпіролідону-25 та 0,5 мМ AsA.

Активність ферментів визначали спектрофотометрично шляхом вимірювання зміни оптичної щільності проби за довжин хвилі 290 та 470 нм для APX та POD, відповідно [4, 13]. Реакційна проба містила 25 мкл білкового екстракту та 975 мкл реакційної суміші відповідного складу (APX: 25 мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 0,25 мМ AsA, 1 мМ H₂O₂; POD: 25 мМ натрій-ацетатний буфер (рН 5,0), 8 мМ гваякол та 9 мМ H₂O₂). Вимірювання оптичної щільності проб проводили на спектрофотометрі СФ-46. Активність ферментів виражали в мікромолях субстрату, окисленого за 1 хв в перерахунку на 1 мг білка. Кількість білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [14].

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 [15].

Результати та обговорення

Отримані нами дані показують, що у інтактних рослин ДТ та нокаутної лінії *cat2* активність APX не відрізнялась (рисунк, а). У контрольних рослин, які інкубувались на середовищі MS активність ферменту через 4 год. демонструвала тенденцію (0,05 < p < 0,1) до зростання на 15 % у ДТ та на 10 % у *cat2*, а через 8 год. – знижувалась до рівня інтактних рослин. Інкубація в присутності 50 та 100 мМ хлориду натрію не викликала змін активності APX у обох досліджуваних ліній. Підвищення концентрації хлориду натрію до 200 мМ спричиняло зниження активності APX у ДТ та *cat2* порівняно з контролем, відповідно, на 16 і 20 % після 4-годинної дії стресу. Проте продовження стресової обробки до 8-ми год. не призводило до змін активності ферменту у нокаутної лінії *cat2* на відміну від ДТ, у якій за дії 200 мМ хлориду натрію спостерігали зменшення активності APX на 20 %.

Дослідження активності POD показало, що в листках інтактних рослин ДТ та лінії *cat2* активність ферменту вірогідно не відрізнялась (рисунк, б). У рослин ДТ змін активності ферменту не було виявлено і після всіх застосованих варіантів обробки протягом 4-х годин, за винятком зростання активності на 15 % при застосуванні для обробки 200

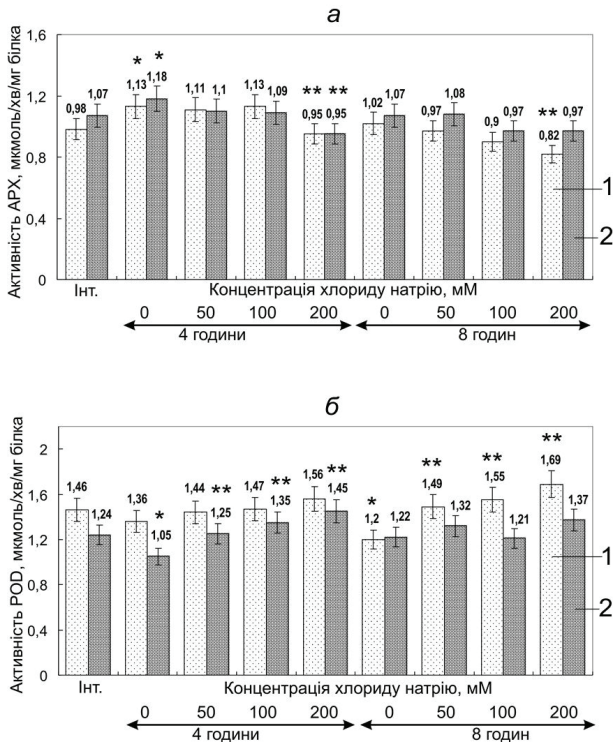


Рисунок. Активність APX (а) та POD (б) у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ) (1) та нокаутної лінії *cat2* (2) за дії сольового стресу. Наведено середні значення, отримані для п'яти незалежних дослідів та їх стандартні відхилення; * – різниця між інтактними (інт.) та контрольними (0) рослинами достовірна, ** – різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна ($p < 0,05$)

мМ NaCl. Проте при інкубації протягом 8-ми год. у контрольних зразках спостерігалось зниження активності POD на 18 %, тоді як обробка хлоридом натрію призводила до залежного від концентрації підвищення активності ферменту на 24–41 % порівняно з контрольними рослинами. Це свідчить про те, що збільшення тривалості стресової обробки у рослин ДТ супроводжується розвитком клітинної відповіді на стрес.

Іншу картину спостерігали для нокаутної лінії *cat2*. У цьому випадку відповідь на дію стресового фактора спостерігали раніше, ніж у рослин ДТ. Так, вже за 4 год. інкубації в присутності 50, 100 та 200 мМ хлориду натрію відбувалось зростання активності POD на 19, 28 та 38 % відповідно. У контрольних зразках, що інкубувались на середовищі МС, спостерігається зниження активності ферменту на 16 %. Проте збільшення тривалості стресової

обробки до 8 год. у рослин лінії *cat2* на відміну від рослин ДТ не призводило до змін активності ферменту порівняно з контролем. Отже, можна припустити, що у нокаутних рослин відбувається адаптація до стресового чинника та перехід до наступної стадії клітинної відповіді рослин.

Таким чином, наші дані свідчать, що POD залучена у відповідь рослинної клітини на дію сольового стресу. У нокаутної лінії реакцію на дію сольового стресу спостерігали раніше, ніж у ДТ, що свідчить про перебудову антиоксидантної системи у *cat2*.

У рослинній клітині каталаза є основним ферментом, який розщеплює пероксид водню [3, 16, 17]. Відповідно, варто було б очікувати, що зниження активності цього ферменту внаслідок мутацій буде мати негативні наслідки для рослини, особливо за дії абіотичних стресових факторів, які спричиняють збільшення вмісту АФК, зокрема – пероксиду водню у клітині. Одним із таких стресових факторів є зростання концентрацій хлориду натрію, який в надлишкових концентраціях зумовлює порушення фотосинтезу та активізацію фотодихання у клітині [16–18]. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що обробка листків арабідопсису ДТ хлоридом натрію у концентрації 50 мМ протягом 4-х год. не призводила до підсилення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), тоді як застосування 100 та 200 мМ NaCl спричиняло підсилення ПОЛ на 19 та 29 %, що є свідченням збільшення вмісту АФК у клітині [19]. Збільшення тривалості обробки до 8-ми годин не призводило до подальшого підсилення ПОЛ, а навпаки – спостерігали його зниження порівняно з контролем, що вказує на індукцію захисних механізмів, а саме – на можливу активізацію антиоксидантних ферментів.

Для перевірки такої можливості нами досліджено зміни активності CAT за дії сольового стресу у листках арабідопсису ДТ та лінії *cat2*, у якої загальна каталазна активність знижена вдвічі [20]. Виявили, що у рослин ДТ за дії 50 та 100 мМ NaCl протягом 4-х год. активність CAT не тільки не зростала, а навіть знижувалась. І лише при застосуванні для обробки 200 мМ NaCl активність цього ферменту залишалась на рівні контролю. Тобто, в умовах більш жорсткого сольового стресу важливість збереження активності CAT зростає. Причиною цього може бути збільшення концентрації H_2O_2 за дії найбільшої із застосованих концентрацій хлори-

ду натрію, що добре узгоджується із нашими даними про підсилення ПОЛ із зростанням концентрації NaCl [19]. Водночас, на відміну від CAT, активність APX та POD у рослин ДТ за дії 50 та 100 мМ NaCl протягом 4-х годин залишалась без змін. Отже, на загальне враження, що застосування такого варіанта стресової обробки не спричиняє значних порушень у клітині і, відповідно, не потребує суттєвих змін у функціонуванні захисних механізмів. Проте при збільшенні концентрації хлориду натрію до 200 мМ пошкодження підсилюються, що супроводжується зниженням активності APX та підвищенням активності POD (див. рис. 1) на фоні збереження активності CAT на рівні контролю.

Характер стресової відповіді у лінії *cat2* на дію 4-годинного сольового стресу виявився дещо іншим. По-перше, на відміну від ДТ інкубування в присутності 50 та 100 мМ хлориду натрію не спричиняло жодних змін активності CAT, а обробка 200 мМ NaCl зумовлювала зростання активності CAT на 26 % вище контрольного рівня [20]. По-друге, зростання активності POD за дії сольового стресу порівняно із контролем було більш вираженим та відмічалось вже при застосуванні найменшої концентрації хлориду натрію (рисунок, б).

При збільшенні тривалості стресу до 8-ми год. спостерігали розвиток захисної реакції. У рослин ДТ для всіх використаних концентрацій NaCl активність каталази виявилась більшою, ніж після 4-годинної обробки, хоча у контролі активність не змінювалась. Це вказує на поступовий розвиток захисної відповіді, елементом якої можна вважати активацію каталази [20]. Крім того, спостерігали зростання активності POD та зниження активності APX (рисунок). У лінії *cat2* характер стресової відповіді був іншим: активність всіх трьох досліджених нами ферментів за дії сольового стресу залишалась без змін порівняно з контрольними зразками. Порівняння характеру стресової відповіді за 4-х та 8-ми годинного сольового стресу показує, що у нокаутної лінії *cat2* активація POD відбувається вже через 4 год., тоді як у ДТ – тільки через 8 год. Тобто, у лінії *cat2* має місце прискорення стресової відповіді.

Отже, зниження каталазної активності у лінії *cat2* внаслідок втрати ізоформи CAT2 супроводжується реорганізацією відповіді антиоксидантної системи на сольовий стрес. Беручи до уваги наші

попередні дані, що рослини ДТ та мутантної лінії *cat2* в однаковій мірі пошкоджуються при обробці хлоридом натрію [20], можна вважати, що ці перебудови забезпечують ефективну компенсацію дефекту антиоксидантної системи, хоча сумарна ферментна активність пероксидаз не компенсує втрату каталазної активності. Відповідно, можна припустити, що у роботі компенсаторних механізмів можуть брати участь інші – як ферментативні, так і неферментативні – механізми.

Висновки

Зниження каталазної активності у листках нокаутної мутантної лінії арабідопсису із втраченою експресією ізоформи CAT2 призводить до змін у функціонуванні антиоксидантної системи (зокрема – до змін у активності пероксидаз, APX та POD) та прискорення розвитку стресової відповіді за дії сольового стресу.

Перелік літератури

1. Wall P.K., Leebens-Mack J., Muller K.F., Field D., Altman N.S., de Pamphilis C.W. PlantTribes: a gene and gene family resource for comparative genomics in plants // Nucl. Acids Res. – 2008. – Vol. 36, Suppl. 1. – P. D970–D976.
2. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 796–815.
3. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 48, № 12. – P. 909–930.
4. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F. Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 129, № 2. – P. 838–853.
5. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schöffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61 – P. 733–746.
6. Miller G.A.D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses // Plant Cell Env. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 453–467.
7. Руснак Т.О., Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність гваяколпероксидази у нокаутної лінії KO-Cat2 *Arabidopsis thaliana* за умов теплового стресу // Физиол. биох. культурных растений. – 2013. – Т. 45, № 3. – С. 246–253.
8. 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. – Т. 9, № 2. – С. 200–209.
9. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* // Вісник УТГіС. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 13–19.
10. Gao S., Ouyang C., Wang S., Xu Y., Tang L., Chen F. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine

- ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings // Plant Soil Env. – 2008. – Vol. 54, № 9. – P. 374–381.
11. Gondim F. A., Gomes-Filho E., Costa J. H., Alencar N. L. M., Prisco J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 56. – P. 62–71.
 12. Mittal S., Kumari N., Sharma V. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 54. – P. 17–26.
 13. Atako K., Chen G., Asada K. Separate assays for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. – 1994. – Vol. 35. – P. 497–504.
 14. 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.
 15. Буджак В.В. Біометрія. – Чернівці: Рута, 2013. – 326 с.
 16. Savouré A., Thorin D., Davey M., Hua X. J., Mauro S., Van Montagu M., Inzé D., Verbruggen N. NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana glauca* L. // Plant Cell Env. – 1999. – Vol. 22, № 4. – P. 387–396.
 17. Miller G.A.D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S.U., Mittler R.O.N. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses // Plant Cell Env. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 453–467.
 18. Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell // Ann. Bot. – 2009. – Vol. 103, № 4. – P. 551–560.
 19. Діденко Н.А., Буздуга И.Н., Волков Р.А., Панчук И.И. Влияние острого солевого стресса на перекисное окисление липидов у *Arabidopsis thaliana* // Buletin stiintific Chişinău. – 2015.
 20. Буздуга I.M., Діденко Н.О., Волков Р.А., Панчук I.I. Диференційна активність ізоформ каталази *Arabidopsis thaliana* за дії солевого стресу // Вісник УТГіС. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 147–153.

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 07.05.2015

АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТ И ГВАЯКОЛ ПЕРОКСИДАЗ У НОКАУТНОГО МУТАНТА *CAT2* *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Н.А. Діденко, И.Н. Буздуга, 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: i.panchuk@chnu.edu.ua

Цель. Стрессовые белки растений, как правило, кодируются мультигенными семействами. Однако специфическая роль отдельных изоферментов все еще остается плохо изученной. Для того, чтобы выяснить, как потеря отдельных изоформ каталазы сказывается на работе других ферментов, расщепляющих пероксид водорода – APX и POD

– была сопоставлена реакция на солевой стресс растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа (ДТ) и нокаутных мутантов по гену *Cat2*. **Методы.** Измерялись активности аскорбат и гваякол пероксидаз при различных вариантах обработки растений хлоридом натрия. **Результаты.** Установлено, что воздействие солевого стресса повышало активность POD в листьях растений ДТ после 8-часовой обработки, а линии *cat2* – 4-часовой. Активность APX у растений ДТ снижалась после обработки 200 мМ хлоридом натрия в течение 8-ми часов, но оставалась без изменений в линии *cat2*. **Выводы.** Снижение каталазной активности в листьях нокаутной мутантной линии арабидопсиса с утраченной экспрессией изоформы CAT2 приводит к перестройке работы антиоксидантной системы (в частности – к изменениям в активности пероксидаз) и ускорению развития стрессового ответа при воздействии солевого стресса.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, мультигенные семейства, нокаутные мутанты, аскорбат и гваякол пероксидаза, каталаза, изоферменты, хлорид натрия.

ACTIVITY OF ASCORBATE AND GUAICOL PEROXIDASES IN *ARABIDOPSIS THALIANA* KNOCKOUT MUTANTS UNDER SALT STRESS

N.O. Didenko, I.M. Buzduga, 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: i.panchuk@chnu.edu.ua

Aim. Plant stress proteins are usually encoded by multigene families. However, the specific roles of the individual isoenzymes are still poorly understood. To elucidate how the loss of some catalase isoforms affects the function of other enzymes that destroy hydrogen peroxide, namely ascorbate and guaiacol peroxidases (APX and POD), the response to salt stress in *Arabidopsis thaliana* wild type (WT) and *Cat2* knockout mutant was compared. **Methods.** The plants were subjected to various regimes of sodium chloride treatment and the activity of APX and POD was measured. **Results.** It was found that the activity of POD in the leaves increased after 8 hours of treatment in WT plants and after 4 hours of treatment in *cat2* knockout line. Activity of APX in WT plants decreased after 8 hours treatment with 200 mM NaCl, but remained unchanged in the *cat2* line. **Conclusions.** The decreased catalase activity in leaves of *cat2* knockout mutant of *Arabidopsis* leads to a readjustment of antioxidant systems (in particular – changes in activity of peroxidases) and accelerates the onset of a stress response to salt stress.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, multigene families, knockout mutants, ascorbate and guaiacol peroxidases, catalase, isoenzymes, sodium chloride.