

УДК 577.218 + 577.151.042:577.152.193

## **ВМІСТ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У НОКАУТНИХ МУТАНТІВ *CAT2 ARABIDOPSIS THALIANA* В УМОВАХ 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  
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012, Україна  
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

**Мета.** У рослин захисна відповідь на абіотичний стрес охоплює індукцію стресових білків та збільшення вмісту низки захисних метаболітів. На сьогодні роль окремих ізоформ антиоксидантних ферментів у стресовій відповіді та їх взаємозв'язок із низькомолекулярними захисними сполуками все ще залишаються недостатньо з'ясованими. Для вивчення цього питання у *Arabidopsis thaliana* дикої типу та у нокаутного мутанту за геном каталази *Cat2* було досліджено вміст поліфенольних сполук (ПФС) за дії сольового стресу. **Методи.** Вимірювався вміст ПФС при різних варіантах обробки рослин хлоридом натрію. **Результати.** Встановлено, що за оптимальних умов культивування вміст ПФС у листках рослин мутантної лінії *cat2* із втраченою активністю ізоформи каталази *CAT2* більший, ніж у рослин арабідопсису дикої типу. Проте, при культивуванні ізольованих пагонів на поживному середовищі у лінії *cat2* вичерпання пулу ПФС відбувається швидше. При цьому, короткотривалий сольовий стрес однаковою мірою підсилює вичерпання пулу ПФС і у рослин ДТ, і у *cat2*. **Висновки.** Зростання вмісту ПФС у листках рослин лінії *cat2* є один з проявів метаболічних перебудов, спрямованих на компенсацію зниження каталазної активності, які є наслідком порушення експресії гена *Cat2*.

**Ключові слова:** мультигенні родини, нокаутні мутанти, поліфенольні сполуки, хлорид натрію, *Arabidopsis thaliana*.

**Вступ.** За останнє десятиліття широко розповсюдженим стало використання нокаутних мутантів для вивчення функції певних генів у рослин. Особливо 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, яка у арабідопсису кодується трьома генами, експресія яких змінюється в залежності від стадії розвитку або дії різних чинників [1–3].

Крім стресових білків, у захисті рослинної клітини важливу роль відіграють низькомолекулярні метаболіти, вміст яких зростає за умов стресу. До таких метаболітів, зокрема, належать поліфенольні сполуки (ПФС), або ж вторинні клітинні метаболіти фенольної природи, які мають антиоксидантні властивості. Останнє зумовлено здатністю ПФС легко вступати в окисно-відновні реакції в якості донорів водню чи електронів та знешкоджувати активні форми кисню (АФК) [4–6].

Одним із лімітуючих факторів продуктивності рослинництва є засолення ґрунтів. Це пов'язано з токсичним впливом надлишку іонів натрію та осмотичним стресом, що викликається у рослинній клітині цими іонами [7–9]. Сольовий стрес зумовлює надвідновлення фотосинтетичного електронтранспортного ланцюга і призводить до утворення АФК, а отже, і до окисдативного стресу [10]. Дослідження впливу сольового стресу на рослинну клітину та механізми її відповіді на молекулярно-генетичному рівні проводяться досить інтенсивно. Проте, вони здебільше присвячені вивченню довготривалого стресу, тоді як механізми відповіді клітини на ранніх етапах стресового впливу все ще вивчені недостатньо.

Для арабідопсису на сьогоднішній день отримано велику кількість нокаутних мутантів, що робить цю рослину популярним модельним видом для генетично-біохімічних досліджень. У даній роботі в якості експериментальної моделі ми використали нокаутну мутантну лінію *cat2* із втраченою активністю ізоформи каталази CAT2. Для визначення ролі ізоформи каталази CAT2 та її взаємозв'язку із неферментною ланкою антиоксидантного захисту було вирішено дослідити характер змін вмісту ПФС у рослин арабідопсису лінії *cat2* на ранніх етапах відповіді на сольовий стрес, викликаний швидким зростанням концентрації хлориду натрію в тканинах листка.

### Матеріали та методи

Для дослідження впливу хлориду натрію використовували 5 тижневі рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикої типу (ДТ: екотип Columbia 0) та нокаутної лінії *cat2*, у якій внаслідок інсерції Т-ДНК втрачена експресія гену *Cat2*. Рослини вирощували в культивативній кімнаті за 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, стресову обробку проводили за умов, що забезпечують його швидке надходження до тканин листків. Відповідно, 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. Рослини поділяли на дві групи, одну з яких залишали в умовах освітлення у культивативній кімнаті, а іншу переносили у темряву. Зразки інкубували 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. По завершенню стресової обробки рослинний матеріал коротко промивали у дистильованій воді для видалення залишків 0,5x MS та хлориду натрію та заморожували у рідкому азоті. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморожували безпосередньо після зрізання. Для кожного варіанту дослідження готували середню пробу з 10–12 рослин.

До 200 мг гомогенізованого у рідкому азоті рослинного матеріалу додавали 600 мкл екстрагуючої суміші (1 % HCl у 96 % етиловому спирті), нагрітої до 40 °С. Проби добре змішували, інкубу-

вали 10 хв за температури 40 °С у термоблоці з постійним помішуванням та центрифугували 10 хв при 12 000 g. Супернатант зберігали за температури 4 °С, а осад піддавали повторній екстракції. Для цього використовували 600 мкл екстрагуючої суміші. Отримані після першої та другої екстракції супернатанти об'єднували. До 100 мкл екстракту додавали 1 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу, інкубували 10 хв у темряві за температури 40 °С у термоблоці та швидко зупиняли реакцію, поміщаючи проби у лід. Паралельно готували холосту пробу, в яку замість екстракту додавали 100 мкл екстракційного буферу.

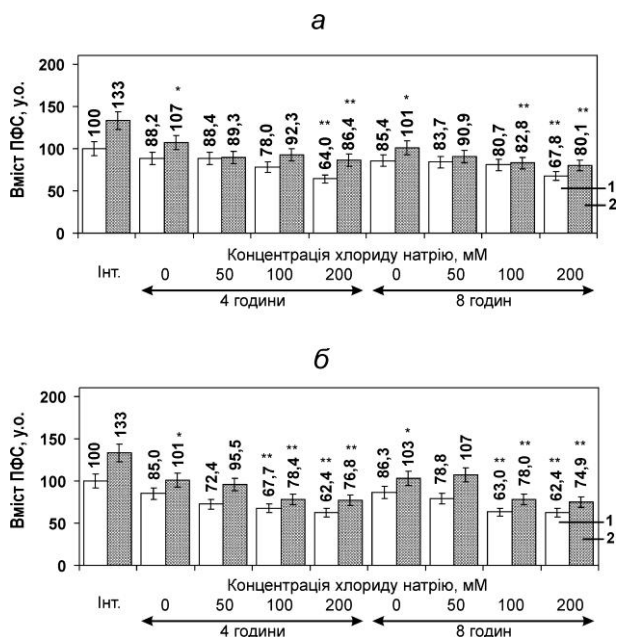
Для визначення вмісту ПФС у пробірку вносили 1,9 мл 3 % карбонату натрію, додавали 1,1 мл екстракту та через півтори години вимірювали оптичну щільність зразка проти контрольної проби за довжини хвилі 765 нм на спектрофотометрі СФ-46. Виходячи з отриманих даних, розраховували вміст ПФС (у мг/г сирої ваги) у пагонах арабідопсису. Для цього використовували калібрувальний графік, побудований попередньо з використанням галової кислоти. Беручи до уваги, що в процесі експерименту рослини втрачали частину води, отримані дані перераховували на початкову вагу рослинного матеріалу.

Експеримент виконували для п'яти незалежно вирощених партій рослин. Для кожного екстракту вміст ПФС вимірювали тричі. Статистичну достовірність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [11].

### Результати та їх обговорення

Отримані дані показують, що за оптимальних умов культивування вміст ПФС у інтактній групі рослин нокаутної лінії *Cat2* був підвищений на 33 % порівняно з *A. thaliana* ДТ (рис. 1).

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що втрата ізоформи CAT2 впливає на сумарну каталазну активність у арабідопсису [12]. Зокрема, каталазна активність у листках 5-тижневих рослин лінії *cat2* становить 51 % від активності у рослин ДТ. Проте, за оптимальних умов культивування рослини лінії *cat2* не показують ознак оксидативного стресу, що вказує на можливі перебудови у роботі антиоксидантної системи, які компенсують зниження активності САТ. Наші нові данні свідчать, що зростання вмісту ПФС — низькомолекулярних сполук, які володіють антиоксидантною активністю — може бути одним з елементів таких компенсаторних перебудов.



**Рисунок 1.** Вміст поліфенольних сполук (у.о. — умовні одиниці) у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (1) та нокаутної лінії *cat2* (2) у темряві (а) та при освітленні (б) за дії сольового стресу. За 100 у.о. приймали вміст ПФС у інтактних листках рослин дикого типу, який становив 2,1 ммоль/г сирової маси. При розрахунках враховано втрати води протягом дослідження. Інт. — інтактні рослини; \* — різниця між контрольними зразками та інтактними рослинами достовірна, \*\* — різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна.

Аналіз отриманих результатів показав, що за дії сольового стресу в умовах темряви вміст ПФС у рослин ДТ зменшувався. Максимальне зниження спостерігалось при використанні для обробки 200 мМ хлориду натрію протягом 4 та 8 годин і становило, відповідно, 27 та 21 % у порівнянні з контрольними пробами.

Подібний характер змін вмісту ПФС виявлено і у рослин нокаутної лінії *cat2*. Так, за дії 200 мМ NaCl протягом 4 та 8 годин вміст ПФС знижувався на 19 та 21 %.

За умов освітлення у обох досліджених ліній на загал спостерігались ефекти, подібні до таких при проведенні стресової обробки у темряві. При цьому, за дії стресу при освітленні у більшості випадків (особливо при використанні для обробки 100 та 200 мМ NaCl) вміст ПФС виявився нижчим, а його зниження у порівнянні з контролем — більш вираженим, ніж у темряві.

Проведені експерименти також свідчать, що як у ДТ, так і у нокаутної лінії *cat2* у контрольній групі рослин (які інкубувались на поживному

середовищі без додавання хлориду натрію) вміст ПФС ставав нижчим, ніж у інтактних рослин. При цьому, у лінії *cat2* залежно від часу інкубації та освітлення це зниження становило 20–24 %, тоді як у рослин ДТ спостерігалась лише тенденція ( $0,05 < p < 0,1$ ) до зниження на 12–15 %. Отже, складається враження, що суттєве зниження активності каталази, яке притаманне лінії *cat2* (втрата основної ізоформи CAT2) спричиняє пришвидшене виснаження пулу ПФС.

Таким чином, отримані дані свідчать, що за умов експерименту у досліджуваних ліній вміст ПФС у листках не тільки не зростає, а навпаки — знижується. Можливим поясненням такої картини може бути поступове виснаження пулу ПФС за відсутності їх ефективного компенсаторного синтезу. Цей ефект підсилюється за дії короткотривалого сольового стресу, що опосередковано вказує на підсилення продукції АФК за стресових умов. При цьому, при освітленні виснаження пулу ПФС відбувається сильніше, ніж у темряві. Це спостереження можна пояснити тим, що при освітленні у клітинах листка внаслідок активності електрон-транспортних ланцюгів хлоропластів утворюється більше АФК, ніж у темряві. Проте, як було показано раніше в нашій лабораторії [13], підсилення продукції АФК за умов короткотривалого сольового стресу не призводить до активації процесів перекидного окислення ліпідів. Отже, наявні резерви антиоксидантної системи достатні, щоб протидіяти окислативному стресу, який виникає внаслідок швидкого накопичення іонів натрію у тканинах листків арабідопсису.

Раніше за дії хронічного сольового стресу у кількох видів рослин було встановлено зростання вмісту ПФС [14–15]. При цьому, у різних сортів одного виду інтенсивність зростання корелювала із солестійкістю. Так, для оливи показано зростання цього показника у 1,5 та 2,2 рази лише через 5 місяців обробки 75 та 125 мМ NaCl. Зростання вмісту ПФС у 1,5 рази спостерігалось і у листках сафлору красильного [16] при вирощуванні протягом 3 тижнів в присутності 50 мМ хлориду натрію. Це спостереження добре узгоджується із існуючими уявленнями, що при довготривалому сольовому стресі виникає вторинний окислативний стрес, для протидії якому необхідна активація антиоксидантного захисту, зокрема — підвищення вмісту ПФС. Отже, складається враження, що зростання вмісту ПФС є компонентом захисної відповіді клітини на хронічний сольовий стрес і відображає адаптацію рослин до довготривалої

дії стресового чинника, тоді як на ранніх етапах стресової відповіді відбувається лише зменшення наявного пулу ПФС.

### Висновки

Порівняння рослин ДТ та нокаутної лінії *cat2* показує, що у останньої за оптимальних умов культивування вміст ПФС збільшений. Це можна розглядати як один з проявів метаболічних перебудов, спрямованих на компенсацію зниження каталазної активності, що є наслідком порушення експресії гена *Cat2*. Цей висновок добре узгоджується з спостереженням, що за умов дослідження у лінії *cat2* вичерпання пулу ПФС відбувається швидше, ніж у ДТ. Водночас, короткотривалий сольовий стрес однаковою мірою підсилює вичерпання пулу ПФС і у рослин ДТ, і у *cat2*. Завдяки цьому у нокаутної лінії *cat2* вміст ПФС і в умовах стресу залишається вище (або як мінімум не нижче), ніж у ДТ.

### Перелік літератури

1. Kim Y. H., Kim C. Y., Lee H. S., Kwak S. S. Changes in activities of antioxidant enzymes and their gene expression during leaf development of sweet potato // *Plant Growth Regulation*. — 2009. — Vol. 58, No 3. — P. 235–241.
2. Orendi G. Expression von Katalasen während der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // *Dissertation Verlag Grauer*. — 2001. — 135 p.
3. Panchuk I. I., Zentgraf U., Volkov R. A. Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. — 2005. — Vol. 222, No 5. — P. 926–932.
4. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // *Polish J. Env. Stud.* — 2006. — Vol. 15, No 4. — P. 523–530.
5. Ahmad P., Jaleel C. A., Salem M. A., Nabi G., Sharma S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress // *Critical Rev. Biotech.* — 2010. — Vol. 30, No. 3. — P. 161–175.
6. Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C., Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // *Toxicology*. — 2002. — Vol. 177, No 1. — P. 67–80.
7. Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity // *Ann. Rev. Plant Biol.* — 2000. — Vol. 51, No 1. — P. 463–499.
8. 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.* — 2013. — Vol. 9, No 1. — P. 32–37.
9. Deinlein U., Stephan A. B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J. I. Plant salt-tolerance mechanisms // *Trends Plant Sci.* — 2014. — Vol. 19, No 6. — P. 371–379.
10. Falleh H., Jalleli I., Ksouri R., Boulaaba M., Guyot S., Magné C., Abdelly C. Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances // *Plant Physiol. Biochem.* — 2012. — Vol. 52. — P. 1–8.
11. Буджак В. В. Біометрія. — Чернівці: Рута, 2013. — 326 с.
12. Долиба І. М., Волков Р. А., Панчук І. І. Активність каталази та аскорбат пероксидази у *Cat2* нокаутного мутанту

*Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію // *Вісник УТГІС*. — 2011. — Т. 9, № 2. — С. 200–209.

13. Диденко Н. А., Буздуга І. Н., Волков Р. А., Панчук І. І. Влияние острого солевого стресса на перекисное окисление липидов у *Arabidopsis thaliana* // *Buletin stiintific Chişinău*. — 2015.
14. Parida A., Das A. B., Das P. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures // *J. Plant Biol.* — 2002. — Vol. 45, No 1. — P. 28–36.
15. Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima* // *Plant Physiol. Biochem.* — 2007. — Vol. 45, No 3. — P. 244–249.
16. Abdallah S. B., Rabhi M., Harbaoui F., Zar-kalai F., Lachaal M., Karray-Bouraoui N. Distribution of phenolic compounds and antioxidant activity between young and old leaves of *Carthamus tinctorius* L. and their induction by salt stress // *Acta Physiologia Plantarum*. — 2013. — Vol. 35, No 4. — P. 1161–1169.

Представлена Кунахом В. А.

Надійшла 24.10.2016

### THE CONTENT OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN THE *ARABIDOPSIS THALIANA* KNOCKOUT MUTANT *CAT2* 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  
Kotsiubynski str., 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine  
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

**Aim.** In plants, the defense response to abiotic stress includes induction of stress proteins and increase in content of protective metabolites. To date, the role of specific isoforms of antioxidant enzymes in stress responses and their relation to low-molecular weight protective compounds are still not clarified. To study this question the content of polyphenolic compounds (PPC) was evaluated under salt stress in *Arabidopsis thaliana* wild-type (WT) and in catalase 2 (*Cat2*) knockout mutant plants. **Methods.** PPC content in different variants of treatment with sodium chloride was measured. **Results.** It was shown that under optimal cultivation conditions the content of PPC in leaves of *cat2* mutants is higher than in WT leaves. However, cultivation of isolated shoots in nutrient medium resulted in a faster depletion of the PPC pool in the *cat2* line. Also, short-term salt stress results in equal depletion of the PPC pool in both, WT and *cat2*. **Conclusions.** The increase of PPC content in *cat2* leaves is a manifestation of metabolic alterations that aim to compensate the reduced catalase activity.

**Keywords:** multigenic family, knockout mutants, polyphenolic compounds, sodium chloride, *Arabidopsis thaliana*.