

УДК 577.218 + 577.151.042:577.152.193

## ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ У НОКАУТНИХ МУТАНТІВ *CAT2* ТА *CAT3* *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.** У рослин ферментна та неферментна ланки захисту від стресових впливів довкілля працюють злагоджено, проте роль окремих ізоформ антиоксидантних ферментів та їхній взаємозв'язок із низькомолекулярними захисними сполуками залишається недостатньо з'ясованим. Для вивчення цього питання у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та у нокаутних мутантів за генами каталази *Cat2* та *Cat3* співставлено вміст вільного проліну за дії сольового стресу. **Методи.** Вимірювався вміст вільного проліну при різних варіантах обробки рослин хлоридом натрію. **Результати.** Встановлено, що у листках рослин мутантних ліній *cat2* та *cat3* із втраченою активністю відповідних ізоформ каталази відбувається пригнічення зростання вмісту проліну за умов сольового стресу. Крім того, у лінії *cat3* має місце зниження базового рівня проліну за нестресових умов. **Висновки.** Пригнічення відповіді на дію сольового стресу вказує на можливий зв'язок між перебудовою антиоксидантної системи у нокаутних мутантів по генах *Cat* та регуляцією захисної клітинної відповіді на сольовий стрес.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, нокаутні мутанти, каталаза, пролін, хлорид натрію.

**Вступ.** Рослинна клітина постійно зазнає впливу стресових факторів довкілля. Для протидії цьому в процесі еволюції у клітині виникли захисні механізми, які представлені ферментною та неферментною ланками захисту. Перша з цих ланок включає численні антиоксидантні ферменти, які необхідні для знешкодження активних форм кисню (АФК), що постійно генеруються у рослинній клітині та рівень яких зростає за дії стресу. Як правило, у рослин антиоксидантні ферменти кодуються мультигенними родинками. Залежно від стадії розвитку та за дії різних стресових чинників може експресуватись та чи інша ізоформа ферменту [1–3]. Крім того, вважається, що окремі ізоформи здатні (як мінімум частково) дублювати функції одна одну. Все це забезпечує рослинній клітині надійність та пластичність стресової відповіді. Також захист рослинної клітини забезпечують низькомолекулярні метаболіти, вміст яких зростає за умов стресу. До таких сполук, зокрема, належать поліфеноли, токоферолі, пролін тощо.

Ферментна та неферментна ланки захисту у рослинній клітині працюють злагоджено, проте роль окремих ізоформ антиоксидантних ферментів та їхній взаємозв'язок із низькомолекулярними захисними сполуками залишається недостатньо з'ясованим. Для вивчення цих питань зручно використовувати як експериментальну модель нокаутні мутантні лінії із втраченою активністю окремих ізоформ стресових білків. Відповідно, для наших досліджень обрано нокаутні мутанти арабідопсису за генами каталази *Cat2* та *Cat3*, у яких втрачена активність відповідних ізоферментів. Раніше у нашій лабораторії у цих ліній було встановлено перебудови ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи, які забезпечують компенсацію зниженої активності каталази як за оптимальних умов вирощування, так і за дії теплового стресу та стресу, спричиненого надмірним накопиченням іонів міді та кадмію [4–6]. Проте, досі недослідженою залишається реорганізація антиоксидантного захисту у цих мутантів за дії інших форм абіотичного стресу, зокрема – сольового стресу.

© Н.О. ДІДЕНКО, І.М. БУЗДУГА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК, 2016

Дослідження сольового стресу останнім часом привертають все більшу увагу, оскільки засолення ґрунтів належить до основних лімітуючих факторів продуктивності рослинництва. Особливість впливу хлориду натрію порівняно з іншими абіотичними факторами полягає у його подвійній природі: токсичний вплив надлишку іонів та спричинений ними осмотичний стрес [7–9]. Зважаючи на це, особливу увагу привертає така осмотично активна захисна сполука як пролін [10–11]. Водночас, пролін може бути антиоксидантом [12], а отже – брати участь у підтримці окисно-відновної рівноваги у клітині. Відомо, що накопичення проліну в рослин відбувається після впливу високих і низьких температур, оксидативного стресу, дії ультрафіолетового випромінювання, при вирощуванні за підвищених концентрацій NaCl та важких металів [11, 13–15].

У представленій роботі досліджено вміст вільного проліну у нокаутних мутантних ліній *cat2* та *cat3* 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.) Heynh. дикого типу (ДТ: екотип Columbia 0) та нокаутні лінії *cat2* та *cat3* із втраченою активністю ізоформ каталази CAT2 та CAT3, відповідно. 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, 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. 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 0,5x MS без додавання хлориду натрію. Як додатковий контроль

використовували інтактні рослини, які заморожували у рідкому азоті безпосередньо після зрізання. Для кожного варіанта дослідів готували середню пробу з 10–12 рослин.

Вміст проліну визначали за методикою Бейтса [16]. До 200–300 мг розтертого у рідкому азоті рослинного матеріалу додавали 3 % розчин сульфосаліцилової кислоти у співвідношенні 1:6. Після центрифугування до супернатанту додавали рівні об'єми льодяної оцтової кислоти та нінгідринового реактиву (0,14 М нінгідрин у 60 % оцтовій кислоті та 2,4М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) та інкубували на водяній бані при 90°C протягом 60 хв. По закінченні інкубації зразки охолоджували, додавали по 2 мл толуолу та інтенсивно струшували. Після розділення фаз відбирали верхню забарвлену фазу та вимірювали її оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 520 нм. Кількість проліну в екстракті визначали за допомогою калібрувального графіка, побудованого зі стандартним розчином L-проліну.

Експеримент виконували для п'яти незалежно вирощених партій рослин. Для кожного екстракту вимірювання вмісту проліну здійснювали тричі. Статистичну достовірність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [17].

### Результати та обговорення

Отримані нами дані показують, що за оптимальних умов культивування вміст проліну у листках інтактних рослин *A. thaliana* ДТ та нокаутної лінії *cat2* вірогідно не відрізнявся (рисунки). На відміну від цього, у лінії *cat3* вміст проліну виявився на 22 % нижче, ніж у ДТ. Це спостереження вказує, що втрата активності ізоформи CAT3 та пов'язані з цим перебудови метаболізму мутантних рослин негативно позначаються на вмісті проліну у нестресованих листках.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що втрата ізоформ CAT2 та CAT3 по-різному впливає на сумарну каталазну активність у арабідопсису [5]. Зокрема, каталазна активність у листках 5-тижневих рослин ліній *cat2* та *cat3* становить, відповідно, 51 та 71 % від активності у рослин ДТ. Цікаво, що втрата активності ізоформи CAT2 на відміну від CAT3 не має негативного впливу на базовий вміст проліну, хоча сумарна каталазна активність у лінії *cat2* нижча, ніж у лінії *cat3*. Нагадаємо,

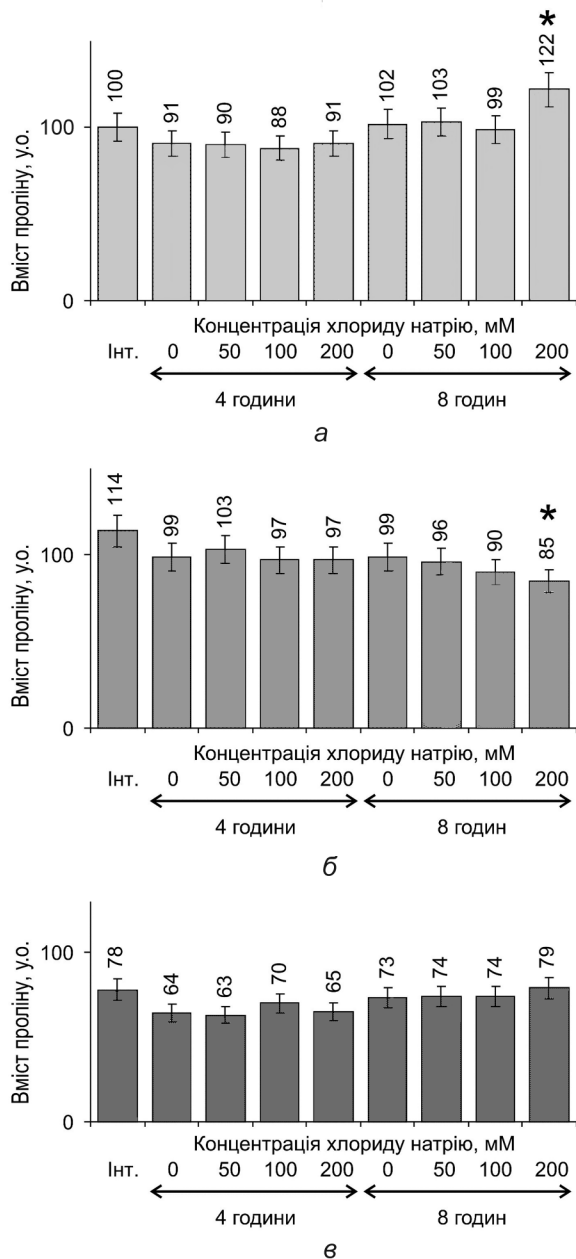
що різниця між ізоформами CAT2 та CAT3 полягає, зокрема, і у тому, що перша з них активна у клітинах мезофілу, а друга – у васкулярних тканинах [18]. Отже, складається враження, що за нестресових умов вміст проліну у листках арабідопсису залежить не стільки від сумарної каталазоної активності, скільки від її розподілу у різних тканинах.

На наступному етапі дослідження листки інкубували у темряві протягом 4 год. на рідкому поживному середовищі 0,5x MS із додаванням 50, 100 та 200 мМ хлориду натрію. Така обробка у всіх досліджуваних лініях не призводила до вірогідних змін вмісту проліну у зразках, які зазнали сольового стресу, порівняно з контрольною групою, хоча за цей час вміст хлориду натрію у листках зростав приблизно в 28 разів, а вміст води падав на 45–50 % (при застосуванні 200 мМ NaCl – дані не наводяться). При цьому, у лінії *cat3* вміст проліну у всіх експериментальних точках залишався нижчим порівняно з ДТ та лінією *cat2*.

За більш тривалої 8-годинної стресової обробки спостерігали іншу картину. У контрольних групах рослин ДТ та нокаутних ліній, які інкубувались на поживному середовищі без додавання хлориду натрію, вміст проліну залишався без змін. Стресо-ва обробка протягом 8 год. у присутності 50 та 100 мМ хлориду натрію також не призводила до суттєвих коливань вмісту проліну у листках досліджуваних рослин. Проте, збільшення концентрації хлориду натрію до 200 мМ викликало зміни цього показника. Так, у рослин ДТ спостерігали зростання вмісту вільного проліну у листках на 22 % ( $p < 0,05$ ), порівняно з контрольною групою рослин, що свідчить про індукцію захисної відповіді на осмотичний стрес.

У той же час у лінії *cat2* спостерігали протилежний ефект. У цьому випадку за дії найвищої концентрації хлориду натрію виявлено тенденцію ( $0,05 < p < 0,1$ ) до зниження вмісту проліну на 15 % порівняно з рослинами, що інкубувались протягом 8 годин на середовищі 0,5x MS. У рослин лінії *cat3*, на відміну від рослин ДТ та лінії *cat2*, змін вмісту проліну за дії 200 мМ хлориду натрію протягом 8 год. не відмічено.

Таким чином, отримані нами дані показують, що в листках арабідопсису ДТ у відповідь на гострий сольовий стрес (зростання вмісту NaCl та зниження вмісту води) відбувається зростання вмісту пролі-



**Рисунок.** Вміст вільного проліну (у.о. – умовні одиниці) у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (а), нокаутних ліній *cat2* (б) та *cat3* (в) за дії сольового стресу. За 100 у.о. приймали вміст проліну у інтактних листках рослин дикого типу, який становив 237 мкМ/кг сирової маси. При розрахунках враховано втрати води протягом дослідження. Наведено середні значення, отримані для п'яти незалежних експериментів та їхні стандартні відхилення; \* – різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна

ну. Раніше при вивченні дії довготривалого сольового стресу на рослини також повідомлялось про зростання вмісту вільного проліну. Так, при вирощуванні цукрового буряка в присутності 50, 100 та 200 мМ хлориду натрію протягом 30 діб спостерігали зростання вмісту проліну у 2–4 рази залежно від сорту та застосованої концентрації [19]; у тютюну через 14 діб при використанні таких же концентрацій відмічено збільшення у 3–6 рази [20]. У наших експериментах найбільше зростання вмісту проліну виявлено у випадку використання 200 мМ хлориду натрію протягом 8 год. і становило лише 22 %. Це можна пояснити тим, що нижчі концентрації NaCl або коротший час обробки слабше стимулюють індукцію захисної реакції у клітині, зокрема – зростання вмісту проліну.

Загальновідомо, що вміст проліну у клітині визначається балансом між процесами його розпаду та синтезу. Проте, захисна реакція на сольовий стрес пов'язана саме з підсиленням синтезу проліну, який залежить від активації експресії відповідних генів. Так, для листків арабідопсису показано, що за 12 год. стресової обробки 100 та 150 мМ хлоридом натрію рівень мРНК гена, що кодує ключовий фермент синтезу проліну P5CS (піролін-5-карбоксилат редуктаза) зростає у 2,5 та 3,5 рази, відповідно [21]. Для листків артишоку за дії 100 мМ NaCl спостерігали зростання рівня мРНК удвічі через 4 та 12 год., тоді як активність ферменту та вміст проліну зростали лише через 12 год. [22].

Порівняння вмісту проліну у рослин арабідопсису ДТ та у мутантних ліній із зниженою активністю каталази показало, що відсутність ізоформ каталази негативно впливає на цей показник. Зокрема, зниження базового вмісту проліну за нестресових умов виявлено лише у лінії *cat3*, тоді як пригнічення стрес-індукованого зростання вмісту проліну спостерігали у обох мутантних лініях. При цьому складається враження, що більше зниження загальної активності каталази у листках, яке має місце у лінії *cat2*, порівняно з лінією *cat3* супроводжується сильнішим пригніченням стресової відповіді.

У попередніх дослідженнях було встановлено, що у нокаутних ліній *cat2* та *cat3* мають місце перебудови антиоксидантної системи, спрямовані на компенсацію втрати активності каталази. Враховуючи, що АФК (зокрема – пероксид водню) та ан-

тиоксидантні сполуки є компонентами сигнальних ланцюгів, які регулюють експресію стресових генів [23, 24], можна припустити, що саме ці перебудови метаболізму у мутантів зумовлюють порушення відповіді на сольовий стрес.

### Висновки

У листках рослин нокаутних мутантних ліній арабідопсису *cat2* та *cat3* із втраченою активністю відповідних ізоформ каталази спостерігали пригнічення зростання вмісту проліну за умов сольового стресу. Крім того, у лінії *cat3* має місце зниження базового рівня проліну за нестресових умов. Отримані дані вказують на можливий зв'язок між перебудовою антиоксидантної системи у нокаутних мутантів по генах *Cat* та регуляцією захисної клітинної відповіді на сольовий стрес.

### 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. Руснак Т.О., Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність гваякол пероксидази у нокаутної лінії *KO-Cat2 Arabidopsis thaliana* за умов теплового стресу // *Физиол. биох. культ. растений*. – 2013. – Т. 45, № 3. – С. 246–253.
5. Доліба 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, No. 2. – С. 200–209.
6. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *cat2* нокаутного мутанту *Arabidopsis thaliana* // *Вісник УТГіС*. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 13–19.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lv W.T., Lin B., Zhang M., Hua X.J. Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis seedlings* during heat stress // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 156, No. 4. – P. 1921–1933.
11. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci*. – 2010. – Vol. 15, No. 2. – P. 89–97.



12. Chen C., Dickman M.B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii* // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 102, No. 9. – P. 3459–3464.
13. Arbona V., Flors V., Jacas J., García-Agustín P., Gómez-Cadenas A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity // Plant Cell Physiol. – 2003. – Vol. 44, No. 4. – P. 388–394.
14. Майор П.С., Захарова В.П., Великожон Л.Г. Зміни вмісту вільного проліну у рослинах озимої пшениці протягом осінньо-зимового періоду // Физиол. биох. культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 371–383.
15. Филиппук Т.В. Вміст проліну як показник толерантності газонних трав до УФ-С випромінювання // Научные труды SWorld. Біологія. Екологія і біотехнологія. – 2013. – Т. 17, Вип. 4. – С. 24–28.
16. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – Vol. 39, No. 1. – P. 205–207.
17. Буджак В.В. Біометрія. – Чернівці: Рута, 2013. – 326 с.
18. Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112, No. 1. – P. 327–336.
19. Ghoulam C., Foursy A., Fares K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars // Env. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 47, No. 1. – P. 39–50.
20. Celik O., Atak C. The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties // Turk. J. Biol. – 2012. – Vol. 36. – P. 339–356.
21. Liu J., Zhu J. K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 114, No. 2. – P. 591–596.
22. Huang Z., Zhao L., Chen D., Liang M., Liu Z., Shao H., Long X. Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem Artichoke plantlets // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, No. 4. – P. 62085.
23. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoel K. ROS signaling: thenew wave? // Trends Plant Sci. – 2011. – Vol. 16, No. 6. – P. 300–309.
24. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schöffl F. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR // J. Exp. Botany. – 2003. – Vol. 54, No. 391. – P. 2343–2349.

Представлено О.М. Тищенко  
Надійшла 10.03.2016

#### СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА У НОКАУТНЫХ МУТАНТОВ *CAT2* И *CAT3* *ARABIDOPSIS* *THALIANA* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Н.А. Диденко, 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.** У растений ферментные и неферментные механизмы защиты от стрессового воздействия окружающей среды работают согласовано, однако роль отдельных изоформ антиоксидантных ферментов и их взаимосвязь с низкомолекулярными защитными соединениями остаются недостаточно изученными. Для изучения этого вопроса у *Arabidopsis thaliana* дикого типа и у нокаутных мутантов по генам каталазы *Cat2* и *Cat3* было сопоставлено содержание свободного пролина при воздействии солевого стресса. **Методы.** Измерялось содержание свободного пролина при различных вариантах обработки растений хлоридом натрия. **Результаты.** Установлено, что в листьях растений мутантных линий *cat2* и *cat3* с утраченной активностью соответствующих изоформ каталазы происходит угнетение возрастания содержания пролина в условиях солевого стресса. Кроме того, у линии *cat3* имеет место снижение базового уровня пролина при нестрессовых условиях. **Выводы.** Угнетение ответа на действие солевого стресса указывает на возможную связь между перестройкой антиоксидантной системы у нокаутных мутантов по генам *Cat* и регуляцией защитного клеточного ответа на солевой стресс.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, нокаутные мутанты, каталаза, пролин, хлорид натрия.

#### FREE PROLINE CONTENT IN *ARABIDOPSIS THALIANA* *CAT2* AND *CAT3* 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.** In plants, the enzymatic and non-enzymatic environmental stress resistance mechanisms function in a concerted manner, but the role of specific isoforms of antioxidant enzymes and their relationship to low molecular weight protective compounds is poorly understood. To investigate this question free proline levels were compared under salt stress conditions in wild-type *Arabidopsis thaliana* and knockout mutants for the catalase genes *Cat2* and *Cat3*. **Methods.** Free proline content was measured under various treatments of plants with sodium chloride. **Results.** It was shown that under salt stress conditions free proline increase is impaired in leaves of mutants lacking *CAT2* and *CAT3* activity. In addition, *cat3* knockout line shows a reduced basal level of proline under non-stress conditions. **Conclusions.** Suppression of response to salt stress points to a possible link between the rearrangement of the antioxidant system in the *Cat* genes knockouts and the regulation of protective cellular response to salt stress.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, knockout mutants, catalase, proline, sodium chloride.