

<https://doi.org/10.15407/frg2020.04.306>

УДК 577.152.1+577.218

ВТРАТА АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ 2 ВПЛИВАЄ НА ОБМІН АСКОРБАТУ В АРАБІДОПСИСУ ЗА ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

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

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
58012 Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

У геномі *Arabidopsis thaliana* містяться три гени — *Cat1*, *Cat2* та *Cat3*, які кодують три ізоформи каталази (САТ). Дві ізоформи (САТ2, САТ3) експресуються у листках і забезпечують розщеплення пероксиду водню, який утворюється у пероксисомах при фотодиханні. Захисна роль САТ за надмірного освітлення (світловий стрес) добре відома, проте залишається незрозумілим, якою є роль ізоформи САТ2 у підтриманні окисно-відновного балансу в клітині за дії окисдативного стресу, що виникає за дії інших стресорів, наприклад, високих концентрацій іонів важких металів. Нами досліджено вплив хлоридів міді та кадмію на вміст низькомолекулярних антиоксидантів, аскорбату/дегідроаскорбату (Asc/DHA) в *A. thaliana* дикого типу та нокаутної мутантної лінії *cat2*, в якій відсутня ізоформа САТ2. Отримані дані свідчать, що у лінії *cat2* відбуваються перебудови метаболізму, які компенсують зниження активності САТ. Ці перебудови, принаймні частково, полягають у активації обміну Asc/DHA. У темряві, за відсутності генерування пероксиду водню у пероксисомах, ці компенсаторні механізми залишаються активними протягом кількох годин (метаболічна «інерція»), що призводить до тимчасового зсуву окисно-відновного балансу в бік відновлення. Зростання вмісту іонів Cu^{2+} у тканинах листка призводить до окиснення Asc до DHA, що індукує захисну відповідь, спрямовану на стабілізацію пулу Asc+DHA. Порівняно з іонами Cu^{2+} підвищення концентрації іонів Cd^{2+} спричинює набагато менші зміни вмісту Asc та DHA. Отримані дані свідчать, що САТ не бере безпосередньої участі у захисті рослин при накопиченні іонів ВМ у листках. Однак пошкодження клітин за відсутності активності САТ2 обмежується внаслідок активації метаболізму Asc/DHA.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, ізоформи каталази, окисдативний стрес, важкі метали, кадмій, мідь, аскорбат, дегідроаскорбат.

Каталаза (САТ) — один із головних ферментів антиоксидантної системи, що знешкоджує пероксид водню у клітині. У фотосинтезуючих тканинах рослин цей фермент локалізований у пероксисомах, де пероксид водню утворюється під час фотодихання [1, 2]. Враховуючи, що пероксид водню є відносно стабільною молекулою, яка здатна проходити крізь мембрани [1, 3], активність САТ важлива для під-

Цитування: Буздуга І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Втрата активності каталази 2 впливає на обмін аскорбату в арабідопсису за дії важких металів. *Фізіологія рослин і генетика*. 2020. 52, № 4. С. 306—319. <https://doi.org/10.15407/frg2020.04.306>

тримки окисно-відновного гомеостазу не тільки у пероксисомах, а й у клітині в цілому [2, 4, 5].

В *Arabidopsis thaliana* виявлено три гени — *Cat1*, *Cat2* та *Cat3*, які кодують три ізоформи САТ. Дві ізоформи — САТ2 і САТ3 — містяться у листках, причому на ізоформу САТ2 припадає більша частина активності — 70 % [4, 5]. Дослідження мутантів із втраченою активністю ізоформ САТ показали, що активність цього ферменту є критично важливою для захисту клітини від надмірного генерування пероксиду водню у пероксисомах за дії надмірного освітлення (світловий стрес) [6, 7]. Однак за умов недостатнього освітлення такі мутанти не мають ознак хронічного оксидативного стресу, оскільки у них відбувається метаболічна компенсація за рахунок активації альтернативних ферментативних і неферментативних механізмів антиоксидантного захисту [4].

Хоча роль САТ за світлового стресу добре вивчена, все ще не з'ясовано, яку роль відіграє цей фермент та його окремі ізоформи у захисті від оксидативного стресу, який не пов'язаний із надмірним генеруванням пероксиду водню у пероксисомах, а виникає за дії інших стресорів, наприклад, високих концентрацій іонів важких металів (ВМ).

Антропогенне забруднення біосфери призводить до зростання накопичення іонів ВМ у рослинах [8]. Деякі ВМ (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni) є необхідними мікроелементами, тоді як інші (Cd, Pb, As, Ag, Hg) не є необхідним компонентом рослинної клітини [8–10]. Невелика кількість мікроелементів необхідна для рослин, оскільки вони є кофакторами багатьох ферментів, однак їх надлишок може призводити до гальмування росту і навіть загибелі рослин [10].

Мідь (Cu) є мікроелементом, що входить до складу багатьох оксидоредуктаз (аскорбатоксидази, пластоціаніну, нітритредуктази, поліфенолоксидази, супероксиддисмутази), які забезпечують численні життєво важливі функції у рослин. Однак іони Cu стають токсичними, коли їх концентрація в тканинах рослин перевищує оптимальний рівень [8]. Як метал, здатний змінювати валентність за фізіологічних умов, Cu може каталізувати утворення гідроксильних радикалів (НО•) в реакції Фентона [11]. Відповідно надлишок міді може викликати оксидативний стрес у рослин [12–15].

Кадмій (Cd) не виконує жодної відомої біологічної функції у рослин і є токсичним елементом навіть за низьких концентрацій [16]. Завдяки високій розчинності у воді солі Cd легко засвоюються коренями і транспортуються до листків через ксилему. На відміну від міді Cd не має окисно-відновних властивостей, проте він за взаємодії з тіоловими групами опосередковано може спричинювати індукцію активних форм кисню (АФК) [10, 12, 13, 17].

АФК постійно утворюються у рослинній клітині за нестресових умов. Їх рівень відчутно зростає за дії абіотичних стресових чинників, таких як екстремальні (низькі та високі) температури, надмірне освітлення, посуха, високі концентрації ВМ тощо [3, 8, 15]. Контроль рівня АФК у рослинній клітині забезпечується функціонуванням складної системи антиоксидантного захисту. До складу останньої

входять як ферменти (супероксиддисмутаза, дегідроаскорбатредуктаза, каталаза, аскорбатпероксидаза), так і низькомолекулярні протекторні сполуки (аскорбат, глутатіон, поліфеноли, токоферолі та ін.) [5, 8, 13–15].

Для розкриття ролі каталази, зокрема найбільш активної у листках ізоформи CAT2, у захисті рослин від надмірних концентрацій солей ВМ ми вирішили дослідити вплив хлоридів Cu та Cd на *Arabidopsis thaliana* дикого типу (ДТ, екотип Col 0) та нокаутну мутантну лінію *cat2*, у якої відсутня ізоформа CAT2, що призводить до зниження загальної активності САТ у листках вдвічі [4, 18, 19]. У наших попередніх дослідженнях було також встановлено, що накопичення іонів Cu^{2+} та Cd^{2+} призводить до зниження активності САТ та аскорбатпероксидази (APX), а також активує пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах листків арабідопсису, що є індикатором оксидативного стресу. При цьому посилення ПОЛ було інтенсивнішим у рослин ДТ, ніж у лінії *cat2*. Зниження активності APX за дії іонів Cu^{2+} було сильнішим у рослин ДТ, а за дії Cd^{2+} — у лінії *cat2* [18–21]. Водночас участь низькомолекулярних антиоксидантів у відповіді цих ліній арабідопсису на дію підвищених концентрацій іонів Cu^{2+} та Cd^{2+} досліджена не була.

Головним низькомолекулярним антиоксидантом рослин є аскорбат (Asc, відновлена форма вітаміну С), який відіграє важливу роль у процесах фотосинтезу, регуляції клітинного циклу, росту та розвитку, запрограмованій загибелі клітин, а також є кофактором низки ферментів [22–24]. За окиснення Asc перетворюється на дегідроаскорбат (DHA, окиснена форма вітаміну С). Співвідношення між Asc та DHA свідчить про ефективність функціонування антиоксидантних систем у рослинній клітині [23–25]. Рівень Asc у клітині визначається балансом між його синтезом, міжклітинним транспортом, окисненням до DHA, регенерацією DHA до Asc у аскорбат/глутатіоновому циклі або остаточним окисненням DHA до дикетогулонової кислоти. Експресія ферментів, які контролюють обмін Asc, регулюється на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях, а їх активність може залежати від алостеричної регуляції [23, 24, 26, 27].

Вміст Asc відіграє центральну роль у стійкості рослин до патогенів, температурного та світлового стресів, посухи та засолення ґрунтів тощо [23–25, 28]. Однак уявлення про роль Asc у підтриманні окисно-відновного балансу в рослинній клітині за дії високих концентрацій іонів ВМ все ще залишаються фрагментарними [23, 25, 29].

Метою нашої роботи було дослідити, як зниження активності САТ у нокаутного мутанта *A. thaliana cat2* позначається на стані аскорбатної ланки антиоксидантного захисту в умовах стресу, який спричинений накопиченням іонів Cu^{2+} та Cd^{2+} у тканинах листка.

Методика

Для дослідження впливу хлоридів Cu та Cd використовували рослини *A. thaliana* (L.) Heynh. екотипу Columbia 0 (ДТ) та нокаутного мутанта *cat2* віком 4,5–5 тижнів. Рослини вирощували за сталої температури +20 °C і освітленні 2000 лк в умовах 16-годинного світлового дня

та відносній вологості повітря 60—70 %. Зважаючи на те що синтез Asc залежить від циркадних ритмів [23], матеріал для проведення стресової обробки завжди відбирали через 2 год після початку світлової фази.

Для отримання інформації про ранню стадію стресової відповіді та з'ясування первинних реакцій рослинної клітини на дію підвищених концентрацій іонів ВМ, здійснювали обробку рослин за умов, що забезпечують швидке надходження їх до тканин листків. Враховуючи, що коренева система є бар'єром, який перешкоджає швидкому надходженню іонів ВМ до листків [17, 30], для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке поживне середовище Мурасиге—Скуга (0,5× МС) [31], що додатково містило хлорид Cu або Cd у концентраціях 0,1; 0,5 та 5 мМ. Стресову обробку проводили у темряві за температури 20 °С протягом 2-х (короткотривалий стрес) та 12-ти (довготривалий стрес) годин. Контрольні рослини інкубували на середовищі без додавання солей ВМ. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморожували безпосередньо після зрізання.

Вміст Asc та ДНА визначали за методом, описаним у літературі [32, 33]. До 150—200 мг розтертого в рідкому азоті рослинного матеріалу додавали 450—600 мкл 2М HClO₄ і центрифугували за 13 000 g протягом 15 хв. 300 мкл отриманої надосадової рідини переносили у чисті мікроцентрифужні пробірки та нейтралізували до рН 5,7 додаванням 1,25 М K₂CO₃. Паралельно готували «холосту» пробу, що містила 2 М HClO₄ та 1,25 М K₂CO₃ в такому ж співвідношенні. Після цього проби центрифугували за 13 000 g протягом 10 хв. Отриману надосадову рідину розділяли на дві частини. В одній з них визначали вміст Asc, у другій — ДНА. Всі операції проводили за температури 4 °С.

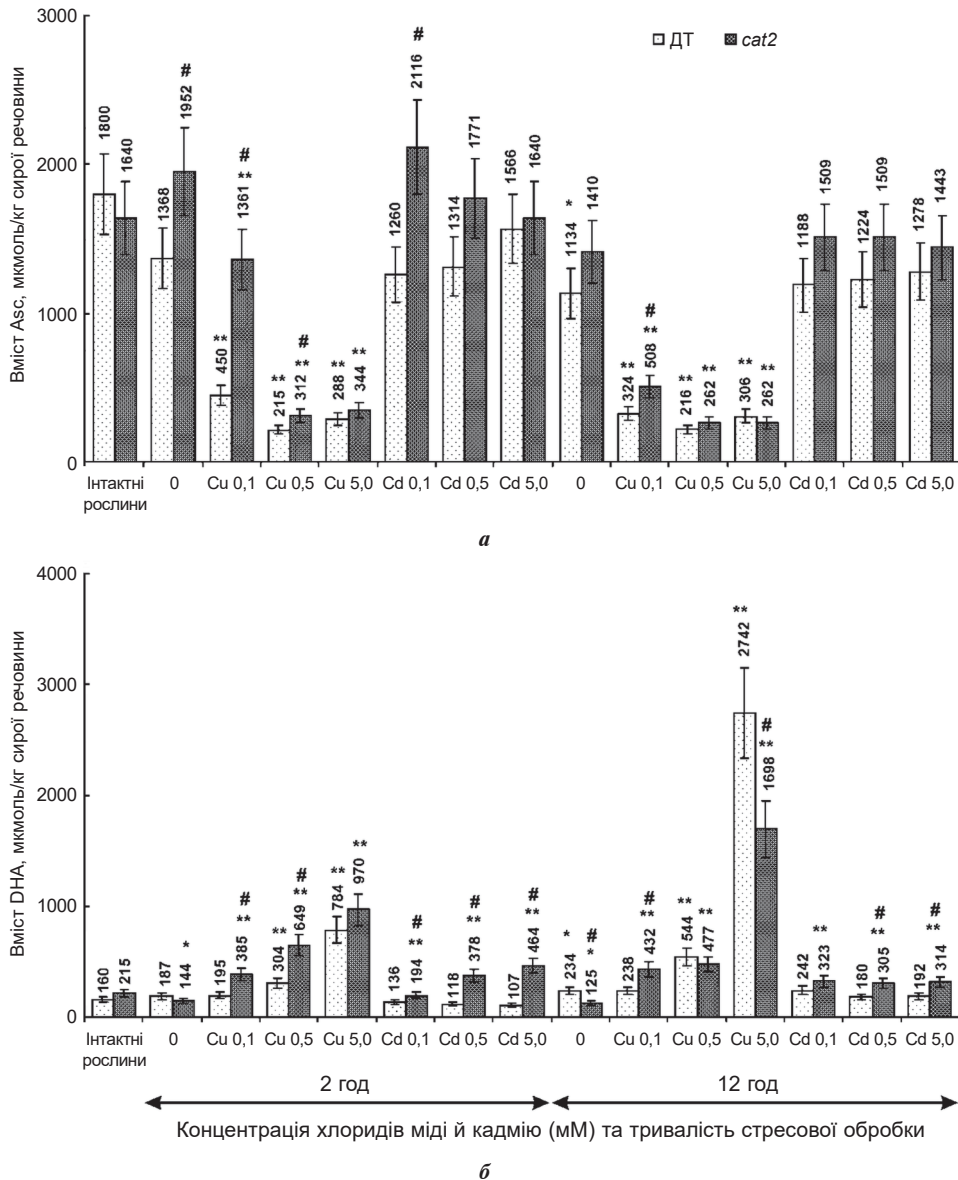
Визначення вмісту Asc базувалось на його окисненні до ДНА за дії аскорбатооксидази (AsOX, Sigma, USA) та спостереженні змін оптичної густини проби за довжини хвилі 265 нм. Дослідна проба містила 940 мкл 100 мМ калій-фосфатного буфера (рН 5,7), 50 мкл екстракту або «холостої» проби та 10 мкл (1 од.) AsOX. Оптичну густину проби вимірювали безпосередньо після додавання AsOX та через 3 хв.

Вміст ДНА визначали, порівнюючи оптичну густину проби до і після відновлення ДНА до Asc за наявності дитіотрейтолу (ДТТ). Реакційна проба містила 910 мкл 100 мМ К-фосфатного буфера (рН 5,7), 40 мкл 30 мМ ДТТ та 50 мкл екстракту або «холостої» проби. Оптичну густину проби вимірювали безпосередньо після додавання надосадової рідини до реакційної суміші та через 1,5 год інкубування за температури +20 °С. Вміст Asc та ДНА виражали в мікромолях у перерахунку на 1 кг сирої речовини листків рослин *A. thaliana*.

Кожний експеримент повторювали 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 [34].

Результати та обговорення

Проведені дослідження показали, що листки інтактних рослин нокаутної лінії *cat2* мають такий самий вміст Asc, як і рослин ДТ (рисунок). Цей результат підтверджує наші попередні дані, що ця мутантна лінія, незважаючи на знижену активність САТ, не має ознак хронічного оксидативного стресу внаслідок активації альтернативних механізмів антиоксидантного захисту, що компенсує дефіцит ізофор-



Вміст Asc та DHA (µмоль/кг сирої речовини) у рослин *A. thaliana* дикого типу (а) та лінії *cat2* (б) після 2- та 12-годинної обробки 0,1, 0,5 та 5 мМ розчинами хлоридів міді та кадмію:

*різниця між інтактними та контрольними рослинами достовірна; **різниця між контрольними та обробленими рослинами достовірна; #різниця між рослинами дикого типу та лінією *cat2* достовірна за $p \leq 0,05$

ми CAT2 [4]. Більше того, у контрольних зразках, які інкубували протягом 2 год на середовищі МС, вміст Asc у лінії *cat2* виявився на 43 % вищим, ніж у рослин ДТ. Для пояснення такої різниці слід взяти до уваги, що листки інтактних рослин знаходились при освітленні, тоді як інкубація листків на середовищі МС відбувалась у темряві. Перенесення листків у темряву припиняє генерування пероксиду водню, пов'язане з фотосинтетичним транспортом електронів у хлоропластах та фотодиханням у пероксисомах, але водночас гальмується і синтез Asc [23], що необхідно для підтримання окисно-відновного балансу. Проте наші нові дані свідчать, що після перенесення у темряву в листках мутантної лінії *cat2* зростає вміст Asc порівняно із ДТ (тобто окисно-відновний баланс зміщується в бік відновлення), що можна вважати результатом «інерції» у роботі альтернативних антиоксидантних механізмів, які активовані у лінії *cat2* і за умов освітлення компенсують надмірне продукування пероксиду водню у пероксисомах за відсутності ізоформи CAT2, тобто ймовірним механізмом компенсації зниженої активності CAT у лінії *cat2* є активація обміну Asc.

Подовження часу інкубації листків у темряві до 12 год призводить до зниження вмісту Asc в обох досліджених ліній, що можна пояснити поступовим вичерпанням пулу Asc. При цьому в листках лінії *cat2* після інкубації протягом 12 год вміст Asc знижувався сильніше порівняно із 2 год, що призводило до зникнення різниці за цим параметром між лінією *cat2* та ДТ. Вочевидь за відсутності фотодихання у темряві різниця між дослідженими лініями арабідопсису за продукцією пероксиду водню зникає, і це супроводжується зниженням компенсаторного синтезу Asc у лінії *cat2*.

Обробка хлоридом міді протягом 2 год спричинювала зниження вмісту Asc та зростання дегідроаскорбату в листках обох досліджуваних ліній арабідопсису (див. рисунок). У наших попередніх дослідженнях було показано, що така обробка призводить до швидкого накопичення іонів Cu^{2+} і залежного від їх концентрації підсилення ПОЛ у тканинах листка [20]. Взявши до уваги, що іони Cu^{2+} провокують утворення у клітині гідроксильних радикалів [10], наші нові результати вказують на участь Asc в їх інактивації за рахунок передачі електрона від молекули Asc та її перетворення на ДНА. Зокрема, за дії 0,1 мМ хлориду міді у *cat2* спостерігалось зменшення вмісту Asc на 30 % порівняно з контролем, тоді як у рослин ДТ виявлено більш істотне зниження — на 67 %. У результаті вміст Asc у листках лінії *cat2* був у 3 рази вищий, ніж у ДТ. Водночас у лінії *cat2* вміст ДНА зростав у 2,7 рази порівняно з контролем, тоді як у ДТ вміст ДНА не змінювався. Відповідно, вміст ДНА у лінії *cat2* був удвічі більший, ніж у ДТ.

Загалом, за дії 0,1 мМ хлориду міді протягом 2 год у листках рослин ДТ сумарний пул Asc+ДНА зменшувався на 59 %, що можна пояснити незворотним окисненням ДНА [23, 28]. На противагу цьому у лінії *cat2* сумарний пул Asc+ДНА зменшувався лише на 17 %, імовірною причиною чого може бути робота альтернативних захисних механізмів (наприклад, посилений синтез Asc), які активовані у рослин цієї лінії. Очевидно, ці механізми здатні підтримувати пул

Asc+DNA в умовах додаткового оксидативного стресу, який виникає за дії 0,1 мМ хлориду Cu протягом 2 год.

Підвищення концентрації іонів Cu^{2+} в інкубаційному середовищі посилювало зміни вмісту Asc. Так, за дії 0,5 мМ хлориду міді спостерігалось зниження вмісту Asc на 84 % порівняно з контролем як у рослин ДТ, так і *cat2*. Проте подальше збільшення концентрації хлориду міді до 5 мМ не супроводжувалось статистично вірогідним зниженням вмісту Asc у тканинах листків, що може свідчити про індукцію захисних механізмів. При цьому за дії 0,5 мМ хлориду міді вміст Asc у лінії *cat2* був на 45 % вищий, ніж у рослин ДТ, але за дії 5 мМ хлориду міді різниця між лініями була майже відсутня.

Збільшення концентрації іонів Cu^{2+} в інкубаційному середовищі призводило також до зростання вмісту DNA в обох лініях *A. thaliana*. Максимальне зростання вмісту DNA за дії 5 мМ хлориду міді у рослин ДТ та лінії *cat2* становило відповідно 4,2 та 6,7 раза порівняно з контролем. За дії 0,5 мМ хлориду міді вміст DNA у лінії *cat2* був у 2,1 раза вищий, ніж у рослин ДТ, тоді як за дії 5 мМ хлориду міді різниця між лініями була статистично недостовірною.

Розрахунок сумарного вмісту Asc+DNA свідчить, що зростання концентрації хлориду міді в інкубаційному середовищі до 0,5 мМ супроводжувалось зменшенням цього показника порівняно із обробкою 0,1 мМ розчином. На противагу цьому збільшення концентрації хлориду міді до 5 мМ приводило до збільшення сумарного вмісту Asc+DNA за рахунок накопичення DNA. Це спостереження підтверджує висунуте вище припущення про індукцію захисних механізмів у відповідь на зростання вмісту іонів Cu^{2+} у середовищі. Інтенсивність цієї захисної відповіді залежить від концентрації токсиканта. З урахуванням того, що зростання пулу було пов'язане з накопиченням DNA, можна припустити, що за умов стресу посилювався саме синтез Asc де novo, тоді як його регенерація з DNA відігравала меншу роль.

На наступному етапі дослідження час обробки хлоридом міді було збільшено до 12 год. Наші попередні результати показали, що це призводить до зростання вмісту іонів Cu^{2+} у тканинах листка у 2–3 рази порівняно з обробкою протягом 2 год [20]. За 12 год інкубації в обох досліджуваних лініях виявлено зниження вмісту Asc (див. рисунок). Загалом відносні втрати Asc порівняно з контролем були такими ж, як і після обробки протягом 2 год. Єдиний виняток становить обробка рослин лінії *cat2* 0,1 мМ хлоридом міді: у цьому випадку встановлено сильніше зниження вмісту Asc, ніж за 2 год обробки. Ці дані узгоджуються із зробленим вище спостереженням для контрольних зразків, що за інкубації у темряві протягом 12 год різниця у вмісті Asc між досліджуваними лініями зменшується.

Щодо вмісту DNA, то за 12 год стресової обробки виявлено більше зростання цього показника порівняно з обробкою протягом 2 год. За дії 5 мМ хлориду міді спостерігалось максимальне підвищення вмісту DNA у листках рослин ДТ та лінії *cat2* — відповідно в 12 та 13,5 раза.

Розрахунок сумарного вмісту Asc+DNA показав, що за дії 0,1 та 0,5 мМ хлориду міді протягом 12 год порівняно з обробкою протягом

2 год відносно втрати Asc+DHA у ДТ залишалися без змін, а в лінії *cat2* посилювались. Проте за дії 5 мМ хлориду міді втрати Asc+DHA в обох ліній зменшились. Цей ефект ліпше виражений у ДТ, в результаті чого після обробки 5 мМ хлоридом міді протягом 12 год вміст Asc+DHA у ДТ став в 1,6 раза більший, ніж у *cat2*, та в 2,2 раза вищий, ніж у контрольних зразків ДТ. У лінії *cat2* після такої ж обробки вміст Asc+DHA став лише в 1,3 раза вищий, ніж у контрольних зразках. Це збільшення відбувається за рахунок окисненої форми DHA, на яку в обох ліній за умов стресової обробки припадає 87–90 % загального пулу Asc+DHA.

Отримані результати можна узагальнити так.

1. Альтернативні механізми антиоксидантного захисту, які активовані у рослинах лінії *cat2* для компенсації зниженої активності САТ, за інкубації у темряві протягом 2 год здатні підтримувати підвищений рівень Asc+DHA у цієї лінії як за відсутності надлишку іонів Cu^{2+} , так і на фоні обробки 0,1 та 0,5 мМ хлоридом міді. Після 12 год інкубації у темряві різниця між лінією *cat2* і ДТ зменшується (МС та 0,1 мМ CuCl_2) або зникає (0,5 мМ CuCl_2).

2. Оксидативний стрес за дії хлориду міді призводить до вичерпання пулу Asc+DHA та зростання співвідношення DHA/Asc.

3. За дії хлориду міді відбувається індукція захисної відповіді, яка залежить від концентрації іонів Cu^{2+} у тканинах і, зокрема, спрямована на підтримання вмісту Asc+DHA. Можливими механізмами цього можуть бути посилення синтезу Asc та (або) зменшення незворотного окиснення DHA. У рослин ДТ захисна відповідь виражена сильніше, що виявляється у зростанні вмісту Asc+DHA (внаслідок накопичення DHA) вище від значень, зафіксованих у контрольних зразках та інтактних рослинах. Проте у лінії *cat2* функціонування антиоксидантних захисних механізмів видається ефективнішим, оскільки за дії 5 мМ хлориду міді протягом 12 год у цієї лінії зростання рівня ПОЛ виявилось майже вдвічі меншим, ніж у ДТ [20].

Наступним кроком у дослідженні специфіки стресової відповіді рослин лінії *cat2* було оцінювання впливу різних концентрацій іонів Cd^{2+} на вміст Asc. Раніше нами було встановлено, що за умов досліду спостерігається швидке накопичення іонів Cd^{2+} у тканинах листка, яке супроводжується посиленням ПОЛ. Максимальне зростання ПОЛ за дії 5 мМ хлориду кадмію виявилось у 1,5 (2 год)—2,0 (12 год) раза меншим, ніж за дії хлориду міді у такій самій концентрації [20, 35].

Визначення вмісту Asc виявило, що цей показник вірогідно не змінювався у рослин ДТ та лінії *cat2* за дії 0,1, 0,5 і 5 мМ хлориду кадмію протягом 2 та 12 год (див. рисунок). При цьому за всіх використаних варіантів обробки вміст Asc у зразках лінії *cat2* був дещо вищим, ніж у ДТ. Найбільша різниця між двома лініями в 1,7 раза виявлена за дії 0,1 мМ хлориду кадмію протягом 2 год.

Накопичення іонів Cd^{2+} супроводжувалось зростанням вмісту DHA у лінії *cat2*. Проте цей ефект був значно слабкішим, ніж за дії іонів Cu^{2+} . Зокрема, обробка 0,5 та 5 мМ хлоридом кадмію протягом 2 год спричинювала підвищення вмісту DHA у рослин *cat2* відпо-

відно у 2,6 та 3,2 раза порівняно з контролем. У рослин ДТ вірогідних змін рівня ДНА не спостерігалось. Подовження часу обробки хлоридом кадмію до 12 год не впливало на вміст ДНА у рослин ДТ. Водночас у лінії *cat2* вміст ДНА ставав у 2,4—2,6 раза вищим, ніж у контрольних зразках.

Загалом отримані дані свідчать, що у *A. thaliana* в умовах короткотривалого гострого стресу, спричиненого швидким підвищенням концентрації іонів Cu^{2+} у тканинах листка, відбувається сильніше зниження вмісту Asc та зростання ДНА, ніж за дії іонів Cd^{2+} . Імовірно така різниця зумовлена тим, що за наявності підвищеної концентрації іонів Cu^{2+} посилюється утворення гідроксильних радикалів, які безпосередньо окиснюють Asc до ДНА. Іони Cd^{2+} не мають такої здатності, а в першу чергу зв'язуються з тіольними групами і впливають на вміст Asc опосередковано, порушуючи активність багатьох ферментів та змінюючи вміст глутатіону. Слід також нагадати, що іони Cd^{2+} (на відміну від Cu^{2+}) ефективно індукують синтез фітохелатинів, які їх зв'язують і нейтралізують [29, 36].

Іншими авторами було встановлено, що за умов довготривалого (72 год) впливу 1 та 5 мкМ сульфату кадмію в арабідопсису підвищувався вміст Asc [29]. При цьому вміст кадмію у тканинах листка був приблизно таким, як у наших експериментах за дії 0,5 мМ хлориду кадмію [35]. Порівняння цих результатів свідчить, що за умов довготривалого стресу відбувається адаптація рослин до дії токсиканта, яка зокрема виявляється у зростанні вмісту Asc. Проте за використання вищих концентрацій солей Cu^{2+} та Cd^{2+} за умов довготривалого впливу у деяких видів рослин вміст Asc зменшується [37, 38], що свідчить про перевантаження систем антиоксидантного захисту.

Отримані нами дані дають підставу припустити, що перебудови метаболізму, які компенсують зниження активності САТ у нокаутної лінії *cat2*, частково полягають в активації обміну Asc. У темряві, за відсутності генерування пероксиду водню у пероксисомах, ці механізми залишаються активними (метаболічна «інерція»), що призводить до тимчасового зміщення окисно-відновного балансу в бік відновлення. Однак протягом 12 год різниця між рослинами ДТ та лінії *cat2* зменшується/зникає.

Зростання вмісту іонів Cu^{2+} у тканинах листка призводить до окиснення Asc до ДНА, що індукує захисну відповідь, спрямовану на стабілізацію пулу Asc+ДНА. Завдяки активнішому обміну Asc зростання вмісту іонів Cu^{2+} спричинює у лінії *cat2* менші порушення (особливо на ранньому — до 2 год етапі стресової відповіді), ніж у рослин ДТ. Підвищення концентрації іонів Cd^{2+} набагато менше змінює пул Asc+ДНА, ніж іонів Cu^{2+} . Однак протекторна дія активнішого обміну Asc у лінії *cat2* виявляє себе і за впливу високих концентрацій іонів Cd^{2+} .

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Reczek C., Chandel N. ROS-dependent signal transduction. *Cur. Opin. Cell Biol.* 2015. 33. P. 8—13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>

2. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Breusegem F.V., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 2010. **61**. P. 4197–4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
3. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2014. **2**. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
4. Buzduga I.M., Volkov R.A., Panchuk I.I. Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytol. Genet.* 2018. **52**, N 1. P. 31–39. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010036>
5. Sharma I., Ahmad P. Catalase: a versatile antioxidant in plants. *Oxidative Damage to Plants*, Elsevier Inc. 2014. P. 131–148. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
6. Queval G., Issakidis-Bourguet E., Hoeberichts F.A., Vandenabeele M., Gakiere B., Vanacker H., 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 H₂O₂-induced cell death. *The Plant J.* 2007. **52**, N 4. P. 640–657. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03263.x>
7. Vandenabeele S., Vanderauwera S., Vuylsteke M., Rombauts S., Langebartels C., Seidlitz H.K., Zabeau M., Montagu M.V., Inze D., Breusegem F.V. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 2004. **39**, N 1. P. 45–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02105.x>
8. Emamveridian A., Ding Y., Mokherdoran F., Xie Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World J.* 2015. **1**. P. 1–18. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/756120>
9. Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.* 2016. **6**. P. 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
10. Ackova D.G. Heavy metals and their general toxicity on plants. *Plant Sci. Today.* 2018. **5**, N 1. P. 15–19. <https://dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.1.355>
11. Liochev S.I. The mechanism of Fenton-like reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Metal ions in biological systems*. CRC Press. 2018. P. 1–39.
12. Zhang H., Lv S., Xu H., Hou D., Li Y., Wang F. H₂O₂ is involved in the metallothionein-mediated rice tolerance to copper and cadmium toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. **18**. P. 1–12. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms18102083>
13. Ghori N.H., Ghori T., Hayat M.Q., Imadi S.R., Gul A., Altay V., Ozturk M. Heavy metal stress and responses in plants. *Int. J. Environm. Sci. Technol.* 2019. **1**. P. 1–22. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
14. Puthur J.T. Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. *South Indian J. Biol. Sci.* 2016. **2**, N 1. P. 9–13. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i1/100335>
15. Khan M.I.R., Khan N.A. Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress. Singapore: Springer, 2017. 329 p. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5>
16. Araujo R.P., de Almeida A.F., Pereira L.S., Mangabeira P.A.O., Souza J.O., Pirovania C.P., Ahnerta D., Baligar V.C. Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicol. Environm. Safety.* 2017. **144**. P. 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
17. Рогозинский М.С., Шелифост А.Е., Костышин С.С., Волков Р.А. Действие ионов тяжелых металлов на растения в культуре *in vitro*. *Физиология и биохимия культ. растений*. 1998. **30**, № 6. С. 465–471.
18. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність каталази та аскорбатпероксидази у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію. *Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2011. **9**, № 2. С. 200–208.
19. Бuzдуга І.М., Панчук І.І. Вплив іонів міді на активність аскорбатпероксидази у нокаутній по каталазі 2 лінії *Arabidopsis thaliana*. *Біол. системи (Науковий вісник Чернівецького університету)*. 2013. **5**, № 4. С. 466–470.
20. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana*. *Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2012. **10**, № 1. С. 13–19.

21. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на активність каталази та аскорбатпероксидази в *Arabidopsis thaliana*. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2012. **44**, № 2. С. 153—161.
22. Ramirez L., Bartoli C.G., Lamattina L. Glutathione and ascorbic acid protect *Arabidopsis* plants against detrimental effects of iron deficiency *J. Exp. Botany*. 2013. **1**. P. 1—20. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert153>
23. Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *J. Exp. Bot.* 2013. **64**. P. 433—443. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers330>
24. Melidou I., Kanellis A.K. Genetic control of ascorbic acid biosynthesis and recycling in horticultural crop. *Front. Chem.* 2017. **5**. P. 1—8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00050>
25. Venkatesh J., Won Park S. Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Bot. Studies*. 2014. **55**. P. 1—19. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-38>
26. Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T., Shigeoka S. Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 2004. **45**. P. 1271—1279. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch152>
27. Valpuesta V., Botella M.A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci.* 2004. **9**, N 12. P. 573—577. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.10.002>
28. Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 2011. **155**. P. 2—18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
29. Jozefczak M., Bohler S., Schat H., Horemans N., Guisez Y., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. (2015). Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of arabidopsis to cadmium. *Ann. Bot.* 2015. **116**, N. 4. P. 601—612. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv075>
30. Язловицька Л.С., Rogozinskyi M.C., Kostyshyn S.C., Волков Р.А. Вплив Cu^{2+} та Ni^{2+} на інтенсивність синтезу РНК у проростках кукурудзи. *Укр. біохім. журн.* 1999. **71**. С. 56—60.
31. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. **15**, N. 3. P. 473—497.
32. Волков Р.А., Панчук І.І., Буздуга І.М. Біохімічні методи дослідження рослин. Чернівці: Рута, 2017. 122 с.
33. Luwe M.W.F. Role of ascorbate in detoxify in ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 1993. **101**. P. 969—976. <https://doi.org/10.1104/pp.101.3.969>
34. Engel J. Signifikante Schule der schlichten Statistik. Fuerth: Filander Verlag, 1997. 115 p.
35. Долиба І.М., Должицька А.Г., Панчук І.І. Швидке накопичення іонів кадмію активує перекисне окислення ліпідів у *Arabidopsis thaliana*. *Біол. системи (Науковий вісник Чернівецького університету)* 2012. **4**, № 4. С. 366—371.
36. Ahmad J., Ali A.A., Baig M.A., Iqbal M., Haq I., Qureshi M.I. Role of phytochelatin in cadmium stress tolerance in plants. *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*. Academic Press, 2019. P. 185—212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00008-5>
37. Karam E.A., Keramat B. Hydrogen sulfide protects coriander seedlings against copper stress by regulating the ascorbate-glutathione cycle in leaves. *J. Plant Process Function*. 2017. **5**, N 18. P. 1—6.
38. Hojati M., Modarres-Sanavy S.A.M., Enferadi S.T., Majdi M., Ghanati F., Farzadfar S., Pazoki A. Cadmium and copper induced changes in growth, oxidative metabolism and terpenoids of *Tanacetum parthenium*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. **1**. P. 1—12. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-017-8846-3>

Отримано 25.03.2020

REFERENCES

1. Reczek, C. & Chandel, N. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Cur. Opin. in Cell Biol.*, 33, pp. 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>
2. Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Breusegem, F.V. & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.*, 61, pp. 4197-4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>

3. Das, K. & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.*, 2, pp. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
4. Buzduga, I.M., Volkov, R.A. & Panchuk, I.I. (2018). Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytol. Genet.*, 52, No. 1, pp. 31-39. <https://doi.org/10.3103/S0095452718010036>
5. Sharma, I. & Ahmad, P. (2014). Catalase: a versatile antioxidant in plants. In Ahmad, P. (Ed.) *Oxidative Damage to Plants*, (pp. 131-148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
6. Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoeberichts, F.A., Vandenabeele M., Gakiere, B., Vanacker, H. & Noctor, G. (2007). 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 H₂O₂-induced cell death. *The Plant J.*, 52, No. 4, pp. 640-657. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03263.x>
7. Vandenabeele, S., Vandenauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Montagu, M.V., Inze, D. & Breusegem, F.V. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.*, 39, No. 1, pp. 45-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02105.x>
8. Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World J.*, 1, pp. 1-18. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/756120>
9. Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P. & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.*, 6, p. 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
10. Ackova, D.G. (2018). Heavy metals and their general toxicity on plants. *Plant Sci. Today*, 5, No. 1, pp. 15-19. <https://dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.1.355>
11. Liochev, S.I. (2018). The mechanism of Fenton-like reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. In *Metal ions in biological systems* (pp. 1-39), CRC Press.
12. Zhang, H., Lv, S., Xu, H., Hou, D., Li, Y. & Wang, F. (2017). H₂O₂ is involved in the metallothionein-mediated rice tolerance to copper and cadmium toxicity. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, pp. 1-12. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms18102083>
13. Ghori, N.H., Ghori, T., Hayat, M.Q., Imadi, S.R., Gul, A., Altay, V. & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 1, pp. 1-22. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
14. Puthur, J.T. (2016). Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. *South Indian J. Biol. Sci.*, 2, No. 1, pp. 9-13. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i1/100335>
15. Khan, M.I.R. & Khan, N.A. (2017). *Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress*. Singapore: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5>
16. Araujo, R.P., de Almeida, A.F., Pereira, L.S., Mangabeira, P.A.O., Souza, J.O., Pirovan, C.P., Ahnerta, D. & Baligar, V.C. (2017). Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicol. Environm. Safety*, 144, pp. 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
17. Rohozynskiy, M.S., Shelifist, A.E., Kostyshyn, S.S. & Volkov, R.A. (1998). Influence of heavy metals ions on plants in vitro. *Fiziologiya i Biokhimiya Kult. Rastenii*, 30, No. 6, pp. 465-471 [in Russian].
18. Doliba, I.M., Volkov, R.A. & Panchuk, I.I. (2011). Activity of catalase and ascorbate peroxidase in Cat2 knock-out mutant of *Arabidopsis thaliana* upon cadmium stress. *Visnik Ukrainського Товариства Генетиків і селекціонерів*, 9, No. 2, pp. 200-208 [in Ukrainian].
19. Buzduga, I.M. & Panchuk, I.I. (2013). Effect of copper on ascorbate peroxidase activity in Cat2 knock-out mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Biological Systems (Scientific Herald of Chernivtsy University)*, 5, No. 4, pp. 466-470 [in Ukrainian].

20. Doliba, I.M., Volkov, R.A. & Panchuk, I.I. (2012). Effect of copper ions on lipid peroxidation in Cat2 knock-out mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Visnik Ukrainskogo Tovarstva Genetikiv i Selekcioneriv*, 10, No. 1, pp. 13-19 [in Ukrainian].
21. Doliba, I.M., Volkov, R.A. & Panchuk, I.I. (2012). Effect of copper on catalase and ascorbate peroxidase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Fiziologiya i Biokhimiya Kult. Rastenni*, 44, No. 2, pp. 153-161 [in Ukrainian].
22. Ramirez, L., Bartoli, C.G. & Lamattina, L. (2013). Glutathione and ascorbic acid protect *Arabidopsis* plants against detrimental effects of iron deficiency. *J. Exp. Bot.*, 1, pp. 1-20. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert153>
23. Gallie, D.R. (2013). The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *J. Exp. Botany*, 64, pp. 433-443. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers330>
24. Melidou, I. & Kanellis, A.K. (2017). Genetic control of ascorbic acid biosynthesis and recycling in horticultural crop. *Front. Chem.*, 5, pp. 1-8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00050>
25. Venkatesh, J. & Won Park, S. (2014). Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Bot. Studies*, 55, pp. 1-19. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-38>
26. Mieda, T., Yabuta, Y., Rapolu, M., Motoki, T., Takeda, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2004). Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol.*, 45, pp. 1271-1279. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch152>
27. Valpuesta, V. & Botella, M.A. (2004). Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci.*, 9, No. 12, pp. 573-577. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.10.002>
28. Foyer, C.H. & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.*, 155, pp. 2-18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
29. Jozefczak, M., Bohler, S., Schat, H., Horemans, N., Guisez, Y., Remans, T., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2015). Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of *Arabidopsis* to cadmium. *Ann. Bot.*, 116, No. 4, pp. 601-612. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv075>
30. Yazlovyt'ska, L.S., Rohozyn'skiy, M.S., Kostyshyn, S.S. & Volkov, R.A. (1999). Cu²⁺ and Ni²⁺ influence on RNA synthesis in maize seedlings. *The Ukr. Biochem. J.*, 71, pp. 56-60 [in Ukrainian].
31. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, No. 3, pp. 473-497.
32. Volkov, R.A., Panchuk, I.I. & Buzduga, I.M. (2017). Biochemical methods for plant studies. *Chernivtsi: Ruta* [in Ukrainian].
33. Luwe, M.W.F. (1993). Role of ascorbate in detoxify in ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.*, 101, pp. 969-976. <https://doi.org/10.1104/pp.101.3.969>
34. Engel, J. (1997). *Signifikante schule der schlichten statistik*. Fuerth: Filander Verlag.
35. Doliba, I.M., Dolzhitska, A.G. & Panchuk, I.I. (2012). Rapid accumulation of the ions of cadmium in leaves of *Arabidopsis* activate the membrane lipid peroxidation. *Biological Systems (Scientific Herald of Chernivtsy University)*, 4, pp. 366-371 [in Ukrainian].
36. Ahmad, J., Ali, A.A., Baig, M.A., Iqbal, M., Haq, I. & Qureshi, M.I. (2019). Role of phytochelatin in cadmium stress tolerance in plants. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 185-212), Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00008-5>
37. Karam, E.A. & Keramat, B. (2017). Hydrogen sulfide protects coriander seedlings against copper stress by regulating the ascorbate-glutathione cycle in leaves. *J. Plant Process Function*, 5, No. 18, pp. 1-6.
38. Hojati, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Enferadi, S.T., Majdi, M., Ghanati, F., Farzadfar, S. & Pazoki, A. (2017). Cadmium and copper induced changes in growth, oxidative metabolism and terpenoids of *Tanacetum parthenium*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1, pp. 1-12. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-017-8846-3>

Received 25.03.2020

LOSS OF CATALASE 2 ACTIVITY AFFECTS THE ASCORBATE METABOLISM IN ARABIDOPSIS UPON HEAVY METAL STRESS

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

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
2 Kotsubinsky St., Chernivtsi, 58012, Ukraine
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Three genes — *Cat1*, *Cat2* and *Cat3* coding for three isoforms of catalase (CAT) are present in the *Arabidopsis thaliana* genome. Two of these isoforms (CAT2, CAT3) are expressed in leaves, splitting hydrogen peroxide, which is generated in peroxisomes by photorespiration. The protective function of CAT upon excessive illumination (light stress) is well documented, but it remains still unclear what is the role of CAT 2 isoform in the maintenance of cellular redox balance upon oxidative stress caused by other stressors, e.g., high concentrations of heavy metal ions. Accordingly, we investigate the effect of copper and cadmium chlorides on the content of low molecular weight antioxidants — ascorbate/dehydroascorbate (Asc/DHA) in *A. thaliana* wild type and the knockout mutant line *cat2*, which lacks the CAT2 isoform. Obtained data indicate that in the *cat2* knockout line metabolic alterations occur, which compensate for the decrease in CAT activity. These alterations are, at least partially, represented by activation of Asc/DHA metabolism. Although no hydrogen peroxide is generated in peroxisomes in the dark, these compensatory mechanisms remain active for several hours (metabolic «inertia»), leading to a transient shift of the redox balance towards reduction. An increase in the Cu^{2+} ions content in the leaf tissues leads to the oxidation of Asc to DHA and to the enhancement of lipid peroxidation, which induces a protective response aimed at stabilizing the Asc+DHA pool. Comparing to the Cu^{2+} ions, increase in the concentration of Cd^{2+} ions causes much smaller changes in the Asc and DHA content. Taking together our data show that CAT is not directly involved in plant protection upon accumulation of HM ions in leaves. However, the lack of CAT2 activity results in limitation of cell damage due to the activation of Asc/DHA metabolisms.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, catalase isoforms, oxidative stress, heavy metals, cadmium, copper, ascorbate, dehydroascorbate.