

## АКТИВНІСТЬ DHAR У РОСЛИН *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

І. М. БУЗДУГА, І. Г. ГАВРИЛЮК, І. І. ПАНЧУК

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

Несприятливі фактори зовнішнього середовища згубно впливають на рослини. Одним із негативних чинників, що суттєво знижує продуктивність сільськогосподарських культур є засолення ґрунтів, яке викликає у рослин сольовий стрес, наслідком чого є підвищена генерація у клітині активних форм кисню (АФК). У вищих рослин існує система захисту від АФК, що включає в себе антиоксидантні ферменти, зокрема, дегідроаскорбатредуктазу (DHAR), яка відіграє важливу роль в регуляції окислювально-відновного стану аскорбату, перетворюючи його окислену форму до відновленої. Відомо, що DHAR має вирішальне значення у захисті рослин від посухи, підвищених температур та надмірного освітлення, дії озону, високих концентрацій іонів важких металів. Проте роль цього ферменту у захисті від сольового стресу вивчена ще недостатньо. Тому метою даної роботи було дослідити вплив короткотривалого сольового стресу на активність DHAR у рослин *Arabidopsis thaliana*.

Для дослідження використовували рослини *A. thaliana* екотипу *Columbia* 0 віком 4,5-5 тижнів. Рослини вирощували за сталої температури +20°C і освітленні 2000 Лк в умовах 16-годинного світлового дня. Для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке середовище Мурасіге-Скуга, яке додатково містило хлорид натрію у концентраціях 50, 100 та 200 мМ. Зразки інкубували на світлі або в темряві протягом 4 та 8 годин. Активність DHAR визначали спектрофотометрично.

Отримані дані показали, що дія сольового стресу протягом 4 годин не викликала достовірних змін активності DHAR у листках арабідопсису, порівняно з контрольними значеннями. Збільшення тривалості сольового стресового впливу до 8 годин за освітлення, як і за умов темряви, призводило до зростання активності DHAR на 20-23% лише за дії найвищої концентрації – 200 мМ. Таким чином, наші дані показують, що для розвитку стресової відповіді та індукції захисних механізмів рослинної клітини необхідний певний час.

Отримані дані свідчать, що DHAR у рослин *A. thaliana* залучена до пізньої фази захисної клітинної відповіді на сольовий стрес. Ступінь активації DHAR залежить від умов стресової обробки та концентрації хлориду натрію в середовищі.

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

**Вступ.** Несприятливі умови навколишнього середовища, такі як різкі коливання температури, підвищена концентрація важких металів, засолення ґрунтів згубно впливають на рослини (Ahmad and Prasad 2012). Найбільш гострою проблемою, що впливає на зниження продуктивності рослинництва у всьому світі є сольовий стрес.

Відомо, що сольовий стрес індукує посилене утворення активних форм кисню (АФК) в рослинній клітині (Das and Roychoudhury, 2014; Gill et al., 2012; Sazzad and Dietz, 2016). Надмірне зростання концентрації АФК може призвести до метаболічних розладів, пошкодження клітин і передчасного старіння або некрозу (Sharma et al., 2012) оскільки АФК можуть реагувати з такими мішенями, як нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди і хлорофіл та порушувати їх структуру (Gill et al.,

2012; Foyer and Shigeoka, 2011; Sharma et al., 2012).

У вищих рослин існує система захисту, що включає в себе антиоксидантні ферменти і неферментативні захисні сполуки (Das and Roychoudhury, 2014; Gupta and Huang, 2014). Зокрема, до антиоксидантної ферментативної ланки належать супероксиддисмутаза, каталаза та ферменти аскорбат-глутатіонового (As-GSH) циклу. Вони діють скоординовано в напрямку захисту клітини від оксидативного стресу (Das and Roychoudhury, 2014; Gallie, 2013; Sharma et al., 2012).

As-GSH цикл становить основну систему детоксикації  $H_2O_2$ , яка функціонує в цитоплазмі, хлоропластах і мітохондріях рослинних клітин (Foyer and Shigeoka, 2011). Одним із компонентів цього циклу є фермент дегідроаскорбатредуктаза (DHAR), яка відіграє важливу роль в регуляції

окислювально-відновного стану аскорбату в рослин, перетворюючи окиснену форму аскорбату (дегідроаскорбат, DHA) до його відновленої форми за участі глутатіону. За відсутності DHAR DHA може піддаватися незворотньому гідролізу до 2,3-дикетогулонової кислоти (Gallie, 2013). Таким чином, DHAR відіграє важливу роль в регуляції окисно-відновного стану рослинної клітини.

Показано, що збільшення активності DHAR в рослинних клітинах сприяє регенерації аскорбату та детоксикації  $H_2O_2$ . Виявлено, що підсилена експресія генів DHAR зумовлює збільшення пулу відновленого аскорбату. Зокрема, надекспресія гена цитозольної DHAR *Arabidopsis thaliana* викликала двократне зростання вмісту аскорбату у трансгенних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* за стресових умов (Yin et al., 2010). Аналогічно, надекспресія цитозольної DHAR у рослин *Arabidopsis thaliana* призводила до зростання вмісту аскорбату у 4,25 рази та редокс статусу As/DHA близько 3-16 разів вище, ніж у рослин дикого типу (Wang et al., 2010).

Крім того, DHAR відіграє важливу роль в процесах росту та розвитку рослин загалом. Це було продемонстровано для рослин *N. tabacum*, в яких було пригнічено експресію DHAR. Ці рослини характеризувались зниженням швидкості росту листків та пагонів, відстроченим часом розмноження і зменшенням ваги. Також спостерігалось зниження продуктивності фотосинтезу в листках, втрата хлорофілу *a*, зниження активності рибулозобісфосфат-карбоксилази/-оксигенази та передчасне старіння зрілих листків (Кароог, 2015).

На сьогодні дослідження DHAR на вищих рослинах в основному ведуться на рослинах арабідопсису, тютюну і сільськогосподарських культур. Різні ізоформи DHAR були виділені і охарактеризовані для таких вищих рослин, як *A. thaliana*, *N. tabacum*, *Z. mays*, *Trifolium repens* і *Physcomitrella patens*. Зокрема, у *A. thaliana* виявлено чотири гени, що кодуєть ізоформи DHAR, які відрізняються за локалізацією в органелах (хлоропластах або мітохондріях) або в цитоплазмі (Zhang et al., 2015).

Було доведено, що DHAR має важливе значення у захисті рослин за дії абіотичних стресових факторів, зокрема посухи, підвищених температур та освітлення, дії озону, важких металів та інших (Gallie, 2013; Wang et al., 2010; Yin et al., 2010; Zhang et al., 2015). Таким чином, DHAR є одним із ключових ферментів, які беруть участь у забезпеченості стійкості рослин за дії абіотичних стресових чинників. Проте,

роль ферменту у захисті від сольового стресу вивчена ще недостатньо. Тому, метою даної роботи було дослідити вплив короткотривалого гострого сольового стресу на активність DHAR у рослин *A. thaliana*.

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

Для дослідження впливу хлориду натрію використовували рослини *A. thaliana* еко типу Columbia 0 віком 4,5-5 тижнів, що росли у ґрунті. Рослини вирощували за сталої температури  $+20^\circ C$  і освітленні 2000 Лк в умовах 16-годинного світлового дня та відносній вологості повітря 60-70 %.

Для того, щоб отримати інформацію про ранню стадію стресової відповіді та з'ясувати первинні реакції рослинної клітини на дію підвищених концентрацій хлориду натрію обробку рослин проводили за умов, що забезпечують його швидке надходження до тканин листків. Відповідно, для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке поживне середовище Мурасіге-Скуга (0,5x MS), яке додатково містило хлорид натрію у концентраціях 50, 100 та 200 мМ. Зразки інкубували на світлі або в темряві за температури  $20^\circ C$  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 вимірювання активності ферменту готували екстракт нативних білків. Для цього заморожений рослинний матеріал гомогенізували з рідким азотом. Для екстракції білків у нативному стані використовували буфер, який складався із 50 мМ трис-НСІ (рН=7,4), 100 мМ хлориду натрію, 2 мМ ЕДТА. 150 мг гомогенізованого у рідкому азоті рослинного матеріалу переносили у мікроцентрифужну пробірку та додавали 450 мкл охолодженого екстракційного буферу. Вміст проб ретельно перемішували та центрифугували на центрифугу Ерпендорф Centrifuge 5415C при  $+4^\circ C$  та 15000 g протягом 15 хвилин. Отриманий супернатант переносили у чисту мікропробірку та зберігали на льоду для подальшого визначення активності ферменту.

Загальну активність DHAR визначали спектрофотометрично за методом, описаним в літературі із деякими модифікаціями (Hossain and Asada, 1984). Для цього у контрольну кювету додавали 1,0 мл реакційної суміші, що містила

50 мМ К-фосфатного буферу (рН=7,0), 2 мМ відновленого глутатіону, 0,2 мМ ДНА. У дослідну кювету, відповідно, додавали 890 мкл реакційного буферу та окремо вносили 100 мкл свіжоприготовленого 2 мМ ДНА і 10 мкл білкового екстракту. Вимірювання зміни оптичної густини проби проводили за довжини хвилі 265 нм на спектрофотометрі СФ-46. Активність ферменту виражали в мкмольх аскорбату за 1 хвилину в перерахунку на 1 мг білка екстракту. За 100 у.о. брали активність ДНАР у листках інтактних рослин.

Всі експерименти було повторено для чотирьох незалежно вирощених партій рослин. Кожне вимірювання проводили у трьох паралельних пробах. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок (Буджак, 2012).

### Результати та їх обговорення.

На першому етапі наших досліджень було вивчено вплив різних концентрацій хлориду натрію на активність ДНАР при здійсненні стресової обробки в умовах темряви. Такий підхід дає можливість «вимкнути» фотосинтетичну ланку метаболізму, яка призводить до утворення АФК у тканинах листків *A. thaliana*.

Отримані дані показали (Рис. 1), що дія сольового стресу протягом 4 годин не викликала достовірних змін активності ДНАР у листках арабідопсису порівняно з контрольними значеннями. Таким чином, можна припустити, що за даних стресових умов ДНАР не приймає участі у первинній клітинній відповіді рослин на засолення.

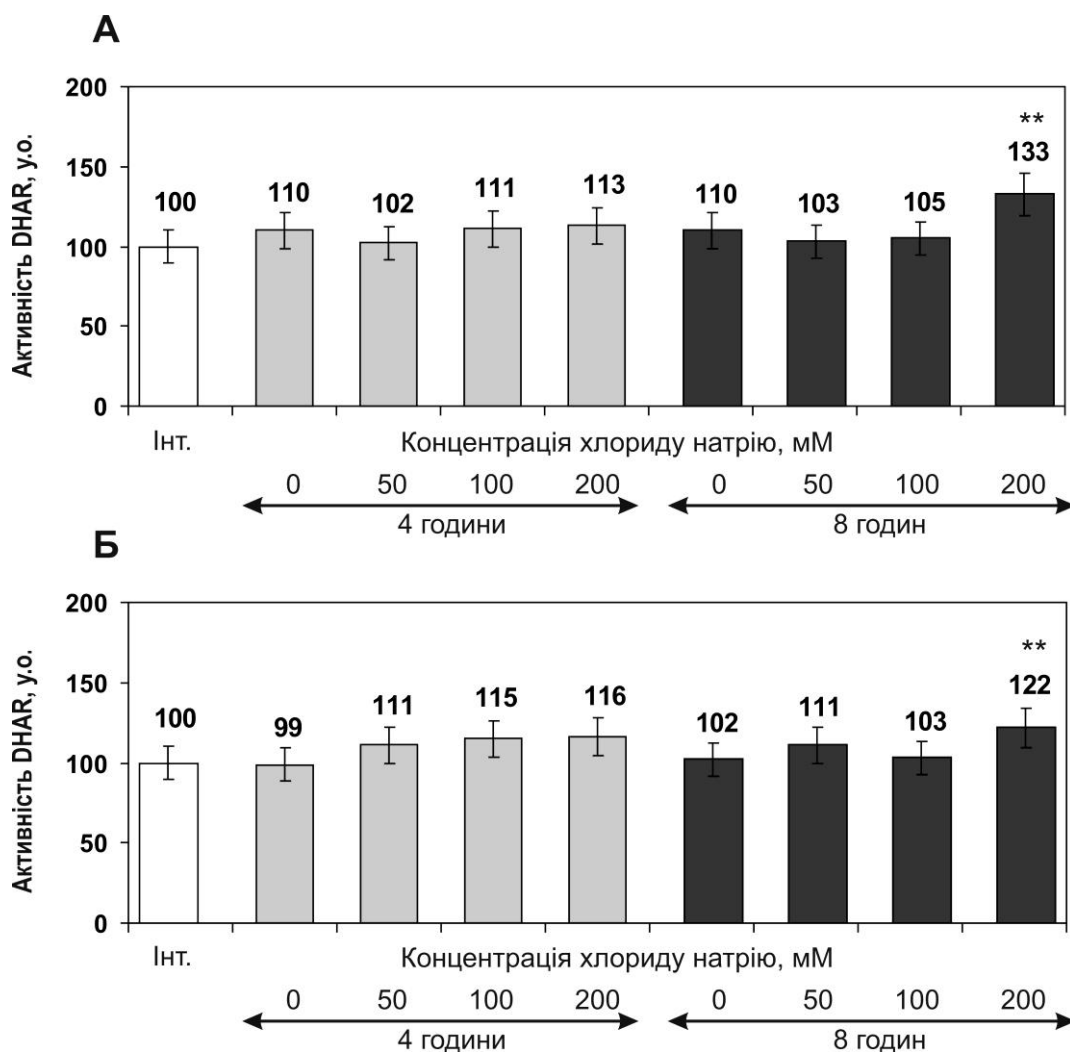


Рисунок 1. Активність ДНАР у листках рослин *Arabidopsis thaliana* за дії різних концентрацій хлориду натрію протягом 4 та 8 годин. А – темрява; Б – освітлення.

Примітка. \*\* - різниця між контрольними та стресованими рослинами достовірна ( $P < 0,05$ ).

Figure 1. The DHAR activity of in *Arabidopsis thaliana* leaves upon different concentrations of sodium chloride for 4 and 8 hours. A – darkness; Б – light.

Note. \*\* - Difference compared to control plants is significant ( $P < 0,05$ ).

Більш тривала сольова стресова обробка (8 годин) в присутності найвищої концентрації хлориду натрію – 200 мМ – викликала зростання активності DHAR на 23% порівняно з контрольними значеннями. В той же час, використання більш низьких концентрацій хлориду натрію – 50 та 100 мМ – не призводило до зміни активності ферменту у порівнянні з контролем.

За умов освітлення відбувається світлозалежне посилення генерації АФК, що, зокрема, слугують сигнальними молекулами для активації клітинної відповіді у рослин. Відповідно, наступний етап наших досліджень полягав у визначенні активності DHAR в листках рослин *A. thaliana*, які зазнавали дії різних концентрацій хлориду натрію протягом 4 та 8 годин в умовах освітлення.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що на відміну від умов темряви, вже за дії 4-годинної стресової обробки в умовах освітлення, активність DHAR у рослин *A. thaliana* мала тенденцію ( $0,05 < P < 0,1$ ) до зростання із збільшенням концентрації хлориду натрію в інкубаційному середовищі (див. рис. 1Б.). Так, зростання активності ферменту на 16 та 17% було виявлено, відповідно за дії 100 та 200 мМ хлориду натрію. Активацію DHAR на світлі можна пояснити участю цього ферменту у знешкодженні АФК, які виникають внаслідок світлозалежного транспорту електронів у хлоропластах.

Збільшення тривалості стресової обробки до 8 годин за дії світла, як і за умов темряви, призводило до зростання активності DHAR на 20% лише за дії найвищої концентрації 200 мМ порівняно з контрольними значеннями. Таким чином, наші дані показують, що за для розвитку стресової відповіді та індукції захисних механізмів рослинної клітини необхідний певний час. Цей висновок добре узгоджується із даними, отриманими нами раніше, де показано, що саме 8 годинний сольовий стрес призводив до зростання активності іншого ферменту антиоксидантного захисту - гваяколпероксидази на 24-41%, порівняно з контролем (Диденко и др., 2015).

Раніше у нашій лабораторії було досліджено вплив гострого короткотривалого сольового стресу на вміст у листках арабідопсису тіобарбітурат-активних продуктів (ТБКАП), які є маркером перекисного окислення мембранних ліпідів. Виявилось, що зростання вмісту ТБКАП у перерахунку на сиру вагу було пов'язано лише із частковою втратою води під час експерименту. За урахування цих втрат зростання вмісту

ТБКАП не спостерігалось, тобто короткотривалий гострий сольовий стрес не призводив до розвитку суттєвого оксидативного ушкодження (Диденко и др., 2015, 2016). Наші нові результати додатково підтримують такий висновок, оскільки виявлене нами зростання активності DHAR – важливого компоненту антиоксидативного захисту – було невеликим (до 20-23%) та спостерігалось лише за дії найбільшої концентрації хлориду натрію протягом 8 год.

На загал аналіз наявних даних свідчить, що за дії гострого короткотривалого сольового стресу у рослин не спостерігається суттєвих оксидативних пошкоджень, які виникають лише при довготривалому (хронічному) стресі. Відповідно, захисну активацію антиоксидантних ферментів слід очікувати при застосуванні більш тривалої стресовою обробки.

Така точка зору добре узгоджується із результатами, отриманими для інших рослин. Зокрема, показано, що у проростках рослин кукурудзи *Zea mays* L. сорту Giza 119 виявлено зростання активності DHAR, як в коренях, так і у листках при вирощуванні рослин протягом 3 тижнів в присутності різних концентрацій хлориду натрію. Так, виявлено, що за дії концентрацій хлориду натрію 75 та 150 мМ активність DHAR у коренях зростала, відповідно, у 1,5 та 2 рази. У молодих листках активність ферменту зростала на 20-25% за обробки обома концентраціями солі, тоді як у старих листках активність DHAR зростала на 30% лише за дії найвищої концентрації хлориду натрію – 150 мМ. (Abdelgawad et al., 2016).

Під час дослідження впливу сольового стресу на рослини індійського рису (*Oryza sativa* L.) сортів Malviya-36 та CSR27 було показано, що за дії 100 мМ хлориду натрію протягом 5-20 днів активність DHAR у обох сортів зростала на 10-15% порівняно з контролем. За проведення сольової стресової обробки 200 мМ хлоридом натрію у рослин сорту Malviya-36 спостерігалось зниження активності ферменту, що зумовлено токсичною концентрацією солі в інкубаційному середовищі. Проте, у рослин сорту CSR27 навпаки було виявлено збільшення активності DHAR на 18%, що пов'язане із їх солестійкістю. Крім того, було показано, що активність ферменту DHAR зростала відповідно до тривалості сольової обробки. На загал ці дані свідчать про участь DHAR у захисті рослин за дії сольового стресу (Mishra et al., 2013).

**Висновки.** Отримані дані свідчать, що DHAR у рослин *A. thaliana* залучена до пізньої фази захисної клітинної відповіді на сольовий стрес. Ступінь активації DHAR залежить від умов

стресової обробки та концентрації хлориду натрію в середовищі.

#### Список літератури:

1. Буджак В.В. Біометрія – Чернівці: Рута. – 2013. – С. 326.
2. Диденко 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. – P. 16-20.
3. Диденко Н.А., Буздуга И.Н., Панчук И.И. Активность аскорбат и гваякол пероксидаз *Arabidopsis thaliana* в условиях солевого стресса // Экологический мониторинг и биоразнообразие. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 14-18.
4. Діденко Н.О. Стан антиоксидантної системи дефіцитних по каталазі мутантів *Arabidopsis thaliana* в умовах сольового стресу. Автореф. дис... канд.біол.наук. Чернівці, 2016. – 21 с.
5. Abdelgawad H., Zinta G., Hegab M. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs // Front. Environ. Sci. – 2016. – V. 7, N 276. – P. 1-11. doi: [10.3389/fpls.2016.00276](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00276)
6. Ahmad P., Prasad M. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability // Plant Science. – 2012. – V. 8. – P. 149-156. doi: [10.1007/978-1-4614-0634-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1).
7. 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. – V. 72. – P. 248-254. doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
8. Chawla S., Jain S., Jain V. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) // J. Plant Biochem. Biotech. – 2012. – V. 22. – P. 27-34. doi: [10.1007/s13562-012-0107-4](https://doi.org/10.1007/s13562-012-0107-4)
9. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // Front. Environ. Sci. – 2014. – V. 2. – P. 1-13. doi: [10.3389/fenvs.2014.00053](https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053)
10. Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis // Plant Physiol. – 2011. – V. 155. – P. 93-100. doi: [10.1104/pp.110.166181](https://doi.org/10.1104/pp.110.166181)
11. Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth // J. Exp. Botany. – 2013. – V. 64, No. 2. – P. 433-443. doi: [10.1093/jxb/err313](https://doi.org/10.1093/jxb/err313)
12. Gill S.S., Singh L.P., Gill R., Tuteja N. Generation and scavenging of reactive oxygen species in plants under stress in: Improving Crop Resistance to Abiotic Stress. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. – 2012. – P. 49-70. doi: [10.1002/9783527632930.ch3](https://doi.org/10.1002/9783527632930.ch3)
13. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // Int. J. Genomics. – 2014. – V. 14. – P. 1-18. doi: [10.1155/2014/701596](https://doi.org/10.1155/2014/701596)
14. Hossain M.A., Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme // Plant Cell Physiol. – 1984. – V. 25, N 1. – P. 85-92. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700)
15. Kapoor D., Sharma R., Handa N., Kaur H., Rattan A., Yadav P., Gautam V., Kaur R., [Bhardwaj R.](https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00013) Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols // Front. Environ. Sci. – 2015. – V. 3, N 13. – P. 1-12. doi: [10.3389/fenvs.2015.00013](https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00013)
16. Koffler B.E., Luschin-Ebengreuth N., Zechmann B. Compartment specific changes of the antioxidative status in *Arabidopsis thaliana* during salt stress // J. Plant Biol. – 2015. – V. 58. – P. 8-16. doi: [10.1007/s12374-014-0264-1](https://doi.org/10.1007/s12374-014-0264-1)
17. Mishra P., Kumari B., Dubey R.S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // Protoplasma. – 2013. – V. 8. – P. 3-19. doi: [10.1007/s00709-011-0365-3](https://doi.org/10.1007/s00709-011-0365-3)
18. Sazzad M., Dietz K-J. Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7, N 548. – P. 1-15. doi: [10.3389/fpls.2016.00548](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00548)
19. Sharma P., Jha A., Dubey R., Pessaraki M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // J. Bot. – 2012. – V. 12. – P. 1-26. doi: [10.1155/2012/217037](https://doi.org/10.1155/2012/217037)
20. Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L. Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* // J. Int. Plant Biology. – 2010. – V. 52. – P. 400-409. doi: [10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x)
21. Yin L., Wang S., Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco // Planta. – 2010. – V. 231. – P. 609-621. doi: [10.1007/s00425-009-1075-3](https://doi.org/10.1007/s00425-009-1075-3)
22. Zhang Y., Wang W., Yang H., Li Y., Kang X. Molecular properties and functional divergence of the dehydroascorbate reductase gene family in lower and higher plants // PLoS ONE. – 2015. – V. 10. – P. 24-78. doi: [10.1371/journal.pone.0145038](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145038)
23. Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang H., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of Fe-SOD, MDHAR, DHAR genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments // Molecules. – 2015. – V 20. – P. 20939-20954. doi: [10.3390/molecules201119741](https://doi.org/10.3390/molecules201119741)

#### References:

1. Abdelgawad H., Zinta G., Hegab M. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs // Front. Environ. Sci. – 2016. – V. 7, N 276. – P. 1-11. doi: [10.3389/fpls.2016.00276](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00276)

2. Ahmad P., Prasad M. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability // *Plant Science*. – 2012. – V. 8. – P. 149-156. doi: [10.1007/978-1-4614-0634-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1).
3. 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. – V. 72. – P. 248-254. doi: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
4. Budhzak V.V. *Biometrics – Chernivtsi: Ruta*. – 2013. – P. 326.
5. Chawla S., Jain S., Jain V. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) // *J. Plant Biochem. Biotech.* – 2012. – V. 22. – P. 27-34. doi: [10.1007/s13562-012-0107-4](https://doi.org/10.1007/s13562-012-0107-4)
6. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // *Front. Environ. Sci.* – 2014. – V. 2. – P. 1-13. doi: [10.3389/fenvs.2014.00053](https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053)
7. Didenko N.O., Buzduga I.M., Panchuk I.I. Ascorbate and guaiacol peroxidase activity in *Arabidopsis thaliana* upon salt stress // *Environmental monitoring and biodiversity*. – 2015. – V. 10, No 3. – P. 14-18.
8. Didenko N.O., Buzduga I.M., Volkov R.A., Panchuk I.I. The influence of acute salt stress on lipid peroxidation in *Arabidopsis thaliana* // *Buletin stiintific. Chişinău*. – 2015. – P. 16-20.
9. Didenko N.O. Antioxidant system of *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants under salt stress. – The thesis for the degree of PhD in Biology. – Chernivtsi, 2016. – 21 p.
10. Foyer C.H., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 155. – P. 93-100. doi: [10.1104/pp.110.166181](https://doi.org/10.1104/pp.110.166181)
11. Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth // *J. Exp. Botany*. – 2013. – V. 64, No. 2. – P. 433-443. doi: [10.1093/jxb/err313](https://doi.org/10.1093/jxb/err313)
12. Gill S.S., Singh L.P., Gill R., Tuteja N. Generation and scavenging of reactive oxygen species in plants under stress in: *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. – 2012. – P. 49-70. doi: [10.1002/9783527632930.ch3](https://doi.org/10.1002/9783527632930.ch3)
13. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // *Int. J. Genomics*. – 2014. – V. 14. – P. 1-18. doi: [10.1155/2014/701596](https://doi.org/10.1155/2014/701596)
14. Hossain M.A., Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme // *Plant Cell Physiol.* – 1984. – V. 25, N 1. – P. 85-92. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076700)
15. Kapoor D., Sharma R., Handa N., Kaur H., Rattan A., Yadav P., Gautam V., Kaur R., Bhardwaj R. Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols // *Front. Environ. Sci.* – 2015. – V. 3, N 13. – P. 1-12. doi: [10.3389/fenvs.2015.00013](https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00013)
16. Koffler B.E., Luschin-Ebengreuth N., Zechmann B. Compartment specific changes of the antioxidative status in *Arabidopsis thaliana* during salt stress // *J. Plant Biol.* – 2015. – V. 58. – P. 8-16. doi: [10.1007/s12374-014-0264-1](https://doi.org/10.1007/s12374-014-0264-1)
17. Mishra P., Kumari B., Dubey R.S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // *Protoplasma*. – 2013. – V. 8. – P. 3-19. doi: [10.1007/s00709-011-0365-3](https://doi.org/10.1007/s00709-011-0365-3)
18. Sazzad M., Dietz K-J. Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7, N 548. – P. 1-15. doi: [10.3389/fpls.2016.00548](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00548)
19. Sharma P., Jha A., Dubey R., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // *J. Bot.* – 2012. – V. 12. – P. 1-26. doi: [10.1155/2012/217037](https://doi.org/10.1155/2012/217037)
20. Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L. Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* // *J. Int. Plant Biology*. – 2010. – V. 52. – P. 400-409. doi: [10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00921.x)
21. Yin L., Wang S., Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco // *Planta*. – 2010. – V. 231. – P. 609-621. doi: [10.1007/s00425-009-1075-3](https://doi.org/10.1007/s00425-009-1075-3)
22. Zhang Y., Wang W., Yang H., Li Y., Kang X. Molecular properties and functional divergence of the dehydroascorbate reductase gene family in lower and higher plants // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – P. 24-78. doi: [10.1371/journal.pone.0145038](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145038)
23. Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang H., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of Fe-SOD, MDHAR, DHAR genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments // *Molecules*. – 2015. – V 20. – P. 20939-20954. doi: [10.3390/molecules201119741](https://doi.org/10.3390/molecules201119741)

## THE ACTIVITY OF DHAR IN ARABIDOPSIS THALIANA UNDER SALT STRESS

**I. M. Buzduha, I. G. Havryljuk, I. I. Panchuk**

*Unfavorable environmental conditions are damaging for plants. One of the negative factors that decreases the yield of crops is salinization of soils, which causes salt stress in plants and, as a result, increased generation of reactive oxygen species (ROS) in the cells. Higher plants have an anti-oxidant defense system that comprises antioxidant enzymes, in particular dehydroascorbate reductase (DHAR), which plays an important role in regulating the redox*

state of ascorbate by reducing its oxidized form. It is known that DHAR is critical for protecting plants from drought, heat, excessive light, ozone and high concentrations of heavy metal ions. Still, the role of this enzyme in salt stress tolerance has not yet been clarified enough. Therefore, the aim of this work was to investigate the effect of short-term salt stress on the activity of DHAR in *Arabidopsis thaliana* plants.

In this study we used 4.5-5 week-old *A. thaliana* plants of the Columbia 0 ecotype. The plants were grown at a constant temperature of +20°C and an illumination of 2000 Lux under a 16-hour photoperiod. For the stress treatment, the aboveground part of the plant was separated from the root system and the cutting place was immersed in liquid Murashige and Skoog medium supplemented with 50, 100 and 200 mM sodium chloride. The specimens were incubated in the light or in the dark for 4 and 8 hours. The activity of DHAR was determined spectrophotometrically.

The obtained data showed that 4 hours of salt stress did not cause significant changes in the activity of DHAR in *Arabidopsis* leaves compared with controls. Increased salt exposure of up to 8 hours led to an increase in DHAR activity by 20-23% only by application of the highest salt concentration (200 mM). This effect was observed in both, light and dark treatment conditions. Thus, our data shows the development of the stress response and the induction of protective mechanisms in the plant cell requires a certain amount of time.

The obtained data indicate that DHAR in *A. thaliana* plants is involved in the late phase of the protective cellular response to salt stress. The degree of activation of DHAR depends on the conditions of stress treatment and the concentration of sodium chloride in the medium.

*Key words:* dehydroascorbate reductase (DHAR), enzymes, reactive oxygen species (ROS), salt stress, *Arabidopsis thaliana*.

Отримано редколегією 20.04.2017