

ВПЛИВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ НА ВМІСТ ПРОЛІНУ ТА ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У *ARABIDOPSIS THALIANA*

Н. О. ДІДЕНКО, Р. А. ВОЛКОВ, І. І. ПАНЧУК*

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

Засолення ґрунтів зумовлює виникнення у рослин осмотичного та оксидативного стресу. Пролін у рослинній клітині виконує роль осмопротектора та може виступати антиоксидантом. Відомо, що накопичення проліну в рослин відбувається після впливу посухи, високих і низьких температур, дії ультрафіолетового випромінювання, при вирощуванні за підвищених концентрацій важких металів. Складовою частиною антиоксидантної системи є також поліфенольні сполуки. У рослинах синтез і накопичення поліфенольних сполук стимулюється у відповідь на біотичні та абіотичні стресові впливи. Проте, місце проліну та поліфенольних сполук у розвитку первинної відповіді на гострий сольовий стрес вивчено недостатньо. Для з'ясування цього питання вивчались зміни вмісту проліну та поліфенольних сполук в листках арабідопсису за дії 50, 100, та 200 мМ хлориду натрію протягом 4 та 8 годин. Для забезпечення швидкого надходження іонів натрію у рослину, при проведенні стресової обробки використовували відокремленні від коріння розетки рослин віком 5 тижнів. Отримані результати свідчать, що 4 годинна стресова обробка 200 мМ хлоридом натрію призводить до зростання вмісту проліну на 42%, а 8 годинна - на 78%. Підвищення концентрації поліфенольних сполук на 20 та 23% відбувається лише через 8 годин за дії 100 та 200 мМ NaCl, відповідно. Таким чином, підвищення вмісту поліфенольних сполук у тканинах листка спостерігається децю пізніше і ефект є слабшим порівняно із вмістом проліну. Отримані дані вказують на залучення проліну та поліфенольних сполук до захисної відповіді рослинної клітини на швидке зростання концентрації іонів натрію у тканинах листків (гострий сольовий стрес).

Ключові слова: сольовий стрес, арабідопсис, пролін, поліфеноли

Вступ. Рослини повсякчас зазнають дії різних стресових факторів абіотичної природи. Одним із таких чинників є засолення ґрунтів, яке на сьогоднішній день належить до лімітуючих факторів продуктивності рослинництва. Особливість впливу хлориду натрію порівняно з іншими абіотичними факторами полягає у його подвійній природі: токсичний вплив надлишку іонів та дія осмотичного стресу (Hasegawa et al., 2000; Sneha et al., 2013; Deinlein et al., 2014). Сольовий стрес зумовлює надвідновлення фотосинтетичного електронтранспортного ланцюга і призводить до утворення активних форм кисню (АФК), а отже, і до оксидативного стресу (Falleh et al., 2012).

Зважаючи на те, що засолення викликає осмотичний стрес, особливу увагу привертає пролін як осмотично активна захисна сполука (Lv et al., 2011; Szabados, Savoure, 2010). Поряд з цим існують дані, що пролін може виступати антиоксидантом (Chen, Dickman, 2005). 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 (Майор та ін., 2009; Szabados, Savoure, 2010; Arbona et al., 2003; Филиппчук 2013).

Поліфенольні сполуки (ПФС), або ж вторинні клітинні метаболіти фенольної природи є складовою антиоксидантної системи рослин, що зумовлено їхньою здатністю легко вступати в окисно-відновні реакції в якості донорів водню чи електронів та інгібувати АФК (Michalak 2006; Ahmad et al., 2010; Sakihama et al., 2002). У рослинах синтез і накопичення ПФС, стимулюється у відповідь на біотичні та абіотичні стресові впливи, такі як дія озону, підвищена концентрація CO₂, температурний стрес, посуха (He et al., 2009; Idso et al., 2000; Rivero et al., 2001; Kirakosyan et al., 2003).

Сьогодні вивчення впливу сольового стресу на метаболічні реакції рослинної клітини є актуальним, проте, як правило, ці дослідження стосуються в основному відповіді клітини на дію тривалого (хронічного) стресу: при вирощуванні протягом кількох діб, тижнів або навіть місяців в присутності підвищених концентрацій солей. Проте, розуміння первинної реакції рослинної клітини на дію стресу залишається поза увагою. Ми зосередили наші дослідження на вивченні впливу короткотривалої дії хлориду натрію на

накопичення проліну та ПФС у листках арабідопсису.

Об'єкт і методи. Дослідження проводили на 5-6 тижневих рослинах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. екотипу Columbia 0 вирощених за сталих умов: температура 20°C, 16-годинний світловий день, інтенсивність освітлення 2,5 кЛк, відносна вологість 60-70%. Для забезпечення швидкого надходження хлориду натрію до надземної частини рослин її відділяли гострим лезом від кореневої частини та занурювали місце зрізу у поживне 0,5 кратне середовище Мурасіге-Скуга (0,5 MS) рН 5.7, в яке попередньо додавали NaCl до кінцевої концентрації 0, 50, 100 або 200 мМ. Рослини інкубували в розчинах солі протягом 4 та 8 годин. По завершенню стресової обробки рослинний матеріал заморожували рідким азотом та зберігали у морозильній камері за -70°C. В якості додаткового контролю використовували листки інтактних рослин, які заморожували безпосередньо після зрізання.

Вміст проліну визначали за методикою Бейтса (Bates et al., 1973). 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 2,4 М H_3PO_4) та інкубували на водяній бані при 90°C протягом 60 хв. По закінченню інкубації зразки охолоджували, додавали по 2 мл толуолу та інтенсивно зтрушували. 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.

Вміст ПФС визначали з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу за модифікованою методикою Rivero et al., 2001. Екстракцію ПФС проводили із 200 мг гомогенізованого рослинного матеріалу, додаючи 1 мл розчину 1% HCl у 96% етанолі. До 100 мкл екстракту додавали 1 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу та інкубували 10 хв у темряві за температури 40°C. Пробу змішували з 1,9 мл 3% карбонату натрію та вимірювали оптичну щільність зразка через 90 хв за довжини хвилі 765 нм. Вміст ПФС розраховували за допомогою калібрувального графіка, використовуючи в якості стандарту галову кислоту.

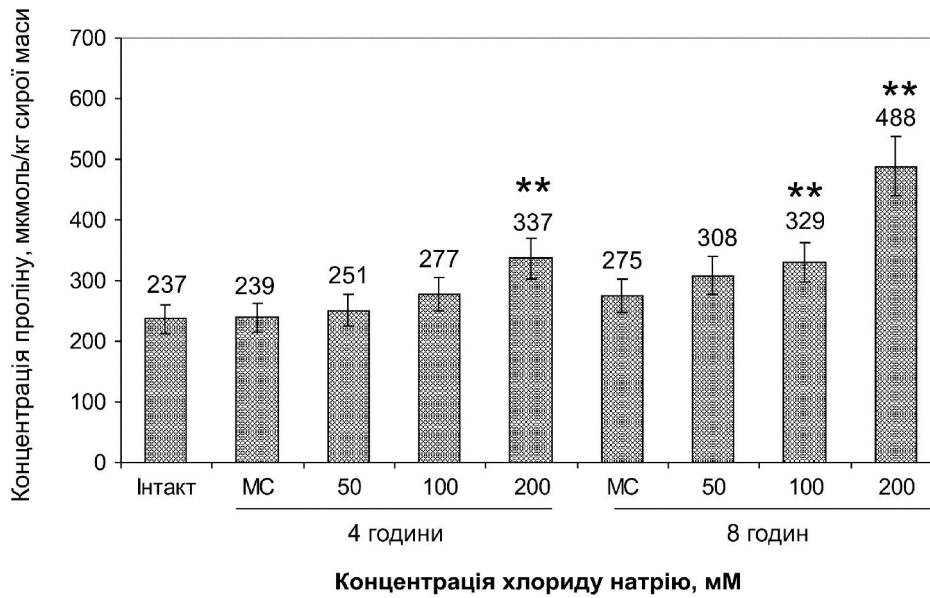
Результати та їх обговорення. В результаті проведених досліджень було встановлено (рис. 1А), що інкубування рослин в присутності 50

розчину хлориду натрію протягом 4 та 8 годин не викликає змін у вмісті проліну у тканинах листків. При збільшенні концентрації до 100 мМ за 8 годинного стресу було відмічено зростання вмісту проліну на 20%. Обробка 200 мМ хлоридом натрію призводила до підняття концентрації проліну вже через 4 години. При цьому подальше збільшення часу інкубації зумовлювало більший ефект. Так, за 4 годинної обробки 200 мМ хлоридом натрію спостерігалось зростання вмісту проліну на 42% у порівнянні з контролем, в той час як при 8 годинній стресовій обробці відмічено зростання на 78%.

Раніше було показано різке зростання вмісту вільного проліну за дії довготривалого стресу. Так, при вирощуванні цукрового буряка в присутності хлориду натрію 50, 100 та 200 мМ протягом 30 діб спостерігалось зростання вмісту проліну у 2-4 рази в залежності від сорту (Ghoulam et al., 2002); у тютюну через 14 діб за таких же концентрацій відмічено збільшення у 3-6 разів (Celik, Atak, 2012). У наших експериментах найбільше зростання було виявлено у випадку використання 200 мМ хлориду натрію протягом 8 годин. Це можна пояснити тим, що нижчі концентрації NaCl або коротший час обробки слабше стимулюють синтезу вільного проліну у клітині, що може бути пов'язано із активацією експресії генів, залучених у цих процес. Так, для листків арабідопсису було показано, що за 12 годин стресової обробки 100 та 150 мМ хлоридом натрію рівень мРНК гену, що кодує ключовий фермент синтезу проліну P5CS (піролін-5-карбоксилат редуктаза) зростає у 2,5 та 3,5 рази, відповідно (Liu, Zhu, 1997). Для листків артишоку за дії 100 мМ NaCl спостерігалось зростання рівня мРНК удвічі через 4 та 12 годин, тоді яку активність ферменту та вмісту проліну зростали через 12 годин (Huang et al., 2013).

Визначення вмісту ПФС показало (рис. 1Б), що за 4 годинної інкубації листків арабідопсису у присутності 50, 100 та 200 мМ хлориду натрію не відбувається змін цього показника. Проте, продовження тривалості стресової обробки до 8 годин призводило до зростання вмісту ПФС на 20 та 23% за дії 100 та 200 мМ NaCl, відповідно. Таким чином, підвищення вмісту ПФС у тканинах листка спостерігається дещо пізніше і ефект є слабшим порівняно із вмістом проліну. Літературні дані свідчать, що вміст ПФС у рослин зростає після довготривалого сольового стресу. Наприклад, для оливи показано зростання цього показника у 1,5 та 2,2 рази лише через 5 місяців обробки 75 та 125 мМ NaCl.

А



Б

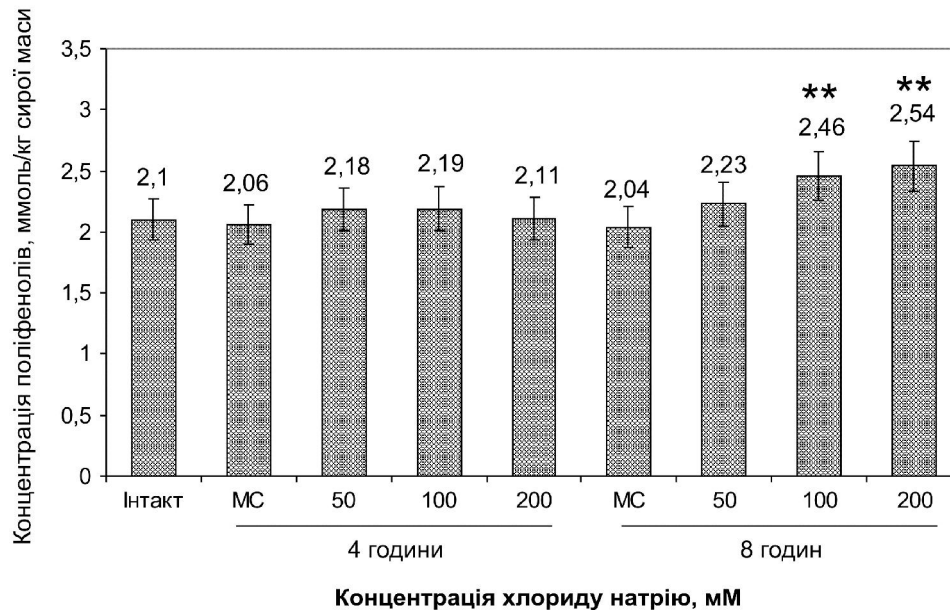


Рис. 1. Вміст проліну (А) та поліфенольних сполук (Б) у листках арабідопсису за дії сольового стресу; ** - різниця між контролем та дослідом достовірна, $P < 0.05$

Fig. 1. Proline (A) and polyphenolic compounds (Б) content in *Arabidopsis* leaves upon salt stress; ** - the difference between the control and treatment groups is significant, $P < 0.05$

Зростання вмісту ПФС у 1,5 рази спостерігалось і у листках сафлору красильного (Abdallah et al., 2013) при вирощуванні протягом 3 тижнів в присутності 50 мМ хлориду натрію. Отже, складається враження, що суттєве зростання вмісту ПФС є компонентом захисної відповіді рослинної клітини на більш пізніх етапах сольового стресу.

Висновки. В цілому отримані нами результати свідчать, що зростання концентрації

проліну та ПФС є компонентом захисної відповіді рослинної клітини на швидке зростання концентрації іонів натрію (гострий соловий стрес).

Список літератури:

1. Майор П. С., Захарова В. П., Великожон Л. Г. Зміни вмісту вільного проліну у рослинах озимої пшениці протягом осінньо-зимового періоду // Физиол. биохим. культурных раст. – 2009.– Т. 41, №5. – С. 371-383.

2. Филипчук 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.
3. Abdallah S.B., Rabhi M., Harbaoui F., Zar-kalai F., Lachaal, M., Karray-Bouraoui N. Distribution of phenolic compounds and antioxidant activity between young and old leaves of *Carthamus tinctorius* L. and their induction by salt stress // Acta Physiologia Plantarum. – 2013. – Vol. 35, No 4. – P. 1161-1169.
4. Ahmad P., Jaleel C. A., Salem M. A., Nabi G., Sharma S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress // Critical Rev. Biotech. – 2010. – Vol. 30, No. 3. – P. 161-175.
5. 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. – 388-394.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Deinlein U., Stephan A.B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J.I. Plant salt-tolerance mechanisms // Trends Plant Sci. – 2014. – Vol. 19, No 6. – P. 371-379.
10. Falleh H., Jalleli I., Ksouri R., Boulaaba M., Guyot S., Magné C., Abdelly C. Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 52. – P. 1-8.
11. 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. – Vol. 47, No 1. – P. 39-50.
12. 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.
13. He X., Huang W., Chen W., Dong T., Liu C., Chen Z. Changes of main secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* in response to ozone fumigation // J. Env. Sci. – 2009. – Vol. 21. – P. 199-203.
14. 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. e2085.
15. Idso C.D., Idso K.E. Forecasting world food supplies: The impact of rising atmospheric CO₂ concentration // Technology. – 2000. – Vol. 7. – P. 33-55.
16. Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P.B., Warber S., Bolling S., Chang S.C. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress // J Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, No 14. – P. 3973-3976.
17. 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.
18. 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.
19. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // Polish J. Env. Studies. – 2006. – Vol. 15, No 4. – P. 523-530.
20. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants // Plant Sci. – 2001. – Vol. 160. – P. 315-321.
21. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // Toxicology. – 2002. – Vol. 177, No 1. – P. 67-80.
22. 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.
23. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2010. – Vol. 15, No 2. – P. 89-97.

References:

1. Abdallah S.B., Rabhi M., Harbaoui F., Zar-kalai F., Lachaal, M., Karray-Bouraoui N. Distribution of phenolic compounds and antioxidant activity between young and old leaves of *Carthamus tinctorius* L. and their induction by salt stress // Acta Physiologia Plantarum. – 2013. – Vol. 35, No 4. – P. 1161-1169.
2. Ahmad P., Jaleel C. A., Salem M. A., Nabi G., Sharma S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress // Critical Rev. Biotech. – 2010. – Vol. 30, No. 3. – P. 161-175.
3. 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. – 388-394.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

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. Falleh H., Jalleli I., Ksouri R., Boulaaba M., Guyot S., Magné C., Abdelly C. Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 52. – P. 1-8.
9. Fylypchuk T.V. Proline content as indicator of tolerance lawn grass to UV-C radiation // Scientific works SWorld. Biology. Ecology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 17, No 4. - P. 24-28.
10. 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. – Vol. 47, No 1. – P. 39-50.
11. 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.
12. He X., Huang W., Chen W., Dong T., Liu C., Chen Z. Changes of main secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* in response to ozone fumigation // J. Env. Sci. – 2009. – Vol. 21. – P. 199-203.
13. 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. e62085.
14. Idso C.D., Idso K.E. Forecasting world food supplies: The impact of rising atmospheric CO₂ concentration // Technology. – 2000. – Vol. 7. – P. 33-55.
15. Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman P.B., Warber S., Bolling S., Chang S.C. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress // J Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, No 14. – P. 3973-3976.
16. 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.
17. 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.
18. Major P.S., Zakharov V.P., Velykozhon L.G. Changes of free proline content in winter wheat plants during the autumn-winter period // Physiol. Biochem. Cultural plants. - 2009. – Vol. 41, No 5. - P. 371-383.
19. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // Polish J. Env. Studies. – 2006. – Vol. 15, No 4. – P. 523-530.
20. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants // Plant Sci. – 2001. – Vol. 160. – P. 315–321.
21. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // Toxicology. – 2002. – Vol. 177, No 1. –P. 67-80.
22. 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.
23. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2010. – Vol. 15, No 2. – P. 89-97.

EFFECTS OF SALINE STRESS ON PROLINE AND POLYPHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

N.O. Didenko, R.A.Volkov, I.I. Panchuk

*Soil salinity causes osmotic and oxidative stress in plants. Proline acts as an osmoprotector and an antioxidant in plant cells. It is known that proline accumulation in plants occurs after exposure to drought, high and low temperatures, ultraviolet radiation and high concentrations of heavy metals. Polyphenolic compounds are also part of the antioxidant system. In plants, the synthesis and accumulation of polyphenolic compounds is stimulated in response to biotic and abiotic stress. However, the role of proline and polyphenolic compounds in the early response to acute salt stress is insufficiently studied. To clarify this question we studied changes in the content of proline and polyphenolic compounds in leaves of *Arabidopsis* upon 50, 100, and 200 mM sodium chloride treatment for 4 and 8 hours. To ensure the rapid inflow of sodium ions in plant during treatment with NaCl 5 week-old *Arabidopsis* rosettes separated from plant roots were used. Our results show that treatment during 4 hours with 200 mM sodium chloride leads to the increase in proline content by 42%, whereas after 8 hours an increase of 78% was observed. A rise in concentration of polyphenolic compounds by 20% and 23% is detected only after 8 hours of treatment with 100 and 200 mM NaCl, respectively. Therefore, the increase of polyphenolic compound content in leaf tissue occurs later and the effect is weaker compared to the content of proline. The obtained data suggests the involvement of proline and polyphenolic compounds in the protective response of the plant cell to rapid increase of sodium concentration in leaf tissues (acute salt stress).*

Key words: salt stress, Arabidopsis, proline, polyphenols

Одержано редколлегією 24.01.2016