

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО СОЛЕВОГО СТРЕССА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ У ARABIDOPSIS THALIANA

Н. А. ДИДЕНКО, И. Н. БУЗДУГА, Р. А. ВОЛКОВ, И. И. ПАНЧУК

### Rezumat

#### **Influența stresului salin acut asupra peroxidării lipidelor la Arabidopsis thaliana.**

Salinizarea solului provoacă la plante un șir de dereglări la nivel celular și este una dintre cauzele principale ale diminuării productivității culturilor. Obiectivul studiului a fost de a clarifica natura peroxidării lipidice (POL) în membranele celulare ale frunzelor de Arabidopsis thaliana (ecotip Columbia 0) în condiții de stres cauzate de creșterea rapidă a concentrației de clorură de sodiu în țesuturile frunzei. S-a stabilit că creșterea POL se manifestă în 4 ore de la debutul stresului, adică la etapele timpurii ale răspunsului celulei vegetale la stresul salin acut. Acest efect depinde de concentrația clorurii de sodiu utilizată pentru tratamentul plantelor și este mai bine pronunțată la lumină decât în întuneric, indicând participarea transportului de electroni în cloroplaste și/sau fotorespirației în generarea formelor active ale oxigenului în condiții de stres salin. În urma măririi timpului acțiunii stresului nu se produce creșterea suplimentară a POL, care este asociată cu inducerea de mecanisme de protecție, în special – activarea enzimelor antioxidante.

**Cuvinte cheie:** stresul salin, forme active de oxigen, peroxidarea lipidică, Arabidopsis thaliana.

### Введение

Одной из причин снижения продуктивности растениеводства являются различные формы абиотического стресса, среди которых важное место занимает засоление почвы [6]. Значение этого стрессового фактора в последние годы возрастает, в том числе – и в результате хозяйственной деятельности человека [19].

Поскольку растения не могут активно избегать воздействия стресса, они реагируют на него, преимущественно на клеточном уровне [8, 10, 13, 15]. Соответственно, познание механизмов клеточного ответа на абиотический стресс имеет важное значение, как в теоретическом, так и в практическом плане, в частности – для создания новых форм растений с повышенной устойчивостью к стрессу.

В растительной клетке при физиологически оптимальных условиях роста возникают активные формы кислорода (АФК), причем на свету их генерация связана главным образом с активностью электрон-транспортной цепи хлоропластов [13]. Различные формы абиотического стресса, в том числе – солевой стресс усиливают продукцию АФК. Так показано, что хлорид натрия в избыточных концентрациях вызывает осмотический стресс, сопровождающийся нарушениями фотосинтеза, активацией фотодыхания и увеличением продукции АФК [1, 17], что приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран [4, 11, 12].

В предшествующих исследованиях значительное внимание было уделено изучению реакции растений на длительный солевой стресс – от 12 часов до нескольких дней (хронический стресс) [9, 16, 18]. Однако почти неисследованным остается острый солевой стресс, вызванный быстрым возрастанием содержанием солей в клетках. В природе резкое возрастание

концентрации солей в окружающей среде может происходить, в частности, при экологических катастрофах, связанных с выбросом в окружающую среду высококонцентрированных солевых растворов, например, отходов химической промышленности [6]. Кроме практического интереса, изучение острого солевого стресса актуально и в теоретическом плане, так как дает возможность понять изменения клеточного метаболизма на ранних этапах стрессового ответа растений. Соответственно, в нашем исследовании было решено сосредоточить усилия на изучении ПОЛ в условиях острого кратковременного (до 8 часов) стресса, вызванного сравнительно высокими (до 200 мМ) концентрациями хлорида натрия у *Arabidopsis thaliana*.

### Материалы и методы исследований

Для исследования влияния хлорида натрия использовали 5-ти недельные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (ДТ: экотип Columbia 0). Растения выращивали в культивационной комнате при температуре 20°C в условиях 16-ти часового светового дня. Интенсивность освещения составляла 2000 люкс.

Для того чтобы получить информацию о ранней стадии клеточной реакции на воздействие повышенных концентраций хлорида натрия, обработку растений проводили в условиях, обеспечивающих его быстрое поступление в ткани листьев. Для этого надземную часть растений отделяли от корневой системы и местом среза погружали в жидкую питательную среду Мурасиге-Скуга (МС), в которой дополнительно содержался хлорид натрия в концентрациях 50, 100 и 200 мМ. После этого образцы инкубировали в темноте или на свету при температуре 20°C в течение 4 и 8 часов. Концентрацию хлорида натрия и время обработки подбирали в предварительных экспериментах. Контрольные растения инкубировали в среде 0,5x MS без добавления хлорида натрия. Как дополнительный контроль использовали интактные растения, которые замораживали в жидком азоте непосредственно после срезания.

Об уровне ПОЛ в тканях листа судили, определяя содержание тиобарбитурат активных продуктов (ТБКАП) с использованием описанного метода [7]. Для экстрагирования ТБКАП к 1 мл 96% ацетона добавляли 100 мг растительного материала, гомогенизированного в жидком азоте, и центрифугировали при +4°C на 14000 g в течение 15 мин. Супернатант переносили в чистую центрифужную пробирку, добавляли 500 мкл дистиллированной воды и 1,5 мл 0,5% тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте. Пробы инкубировали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, доводили 96% ацетоном до 3 мл и охлаждали на льду 10 мин. Затем пробы центрифугировали 10 мин при 3000 g и переносили надосадочную жидкость в чистые пробирки. Параллельно готовили холостую контрольную пробу без добавления растительного материала. Оптическую плотность полученных проб определяли на спектрофотометре СФ-46 на длинах волн 440, 532 и 600 нм и рассчитывали содержание ТБКАП как описано в работе Du and Bramlage [7].

Эксперимент выполняли для пяти независимо выращенных партий растений. Для каждой пробы содержания ТБКАП осуществляли трижды. Статистическую достоверность полученных данных оценивали с использованием t-критерия Стьюдента для зависимых выборок [2].

### Результаты и их обсуждение

Для изучения влияния острого солевого стресса на процессы ПОЛ в тканях листа модельного растения *A. thaliana* нами была использована обработка срезанных побегов в течение 4 и 8 часов хлоридом натрия в концентрациях 50, 100 и 200 мМ. Использование указанных концентраций соответствует данным, имеющимся в литературе. Для того чтобы оценить, какой вклад в ПОЛ вносят АФК, возникающие вследствие фотосинтетического транспорта электронов, стрессовую обработку растений проводили в темноте и при физиологически оптимальном освещении (2000 люкс).

Проведенные нами измерения содержания ТБКАП в тканях листа показали, что инкубация контрольных растений *A. thaliana* в течение 4 часов на среде МС не приводила к изменению этого показателя, тогда как после 8 часов наблюдалось его возрастание на 17-18% как в темноте, так и на свету (рисунок 1).

Инкубация в темноте в течение 4 часов в присутствии разных концентраций хлорида натрия вызывала возрастание содержания ТБКАП. При этом наблюдалась прямая корреляция между увеличением концентрации хлорида натрия и усилением ПОЛ. Так, при использовании 50 мМ NaCl содержание ТБКАП возрастало на 9%, 100 мМ – на 18% и 200 мМ – на 29%. Однако продление времени стрессовой обработки до 8 часов не вызывало дальнейшего усиления процессов ПОЛ. Более того, повышение содержания ТБКАП в условиях стресса по сравнению с контрольными образцами составляло лишь 11 и 13% при использовании для обработки NaCl в концентрации 100 и 200 мМ, соответственно, т. е. было ощутимо меньшим, чем при 4-х часовой обработке.

Несколько иная картина наблюдалась при воздействии на растения арабидопсиса разными концентрациями NaCl на свету. В этих условиях ПОЛ происходило более интенсивно, чем в темноте. Так, при использовании 100 и 200 мМ NaCl выявлено возрастание уровня ТБКАП через 4 часа на 35 и 54%, соответственно. Ранее усиление ПОЛ в условиях хронического солевого стресса наблюдалось у пшеницы, причем устойчивость к стрессу коррелировала с меньшим возрастанием клеточной концентрации перекиси водорода и ПОЛ [14]. Наши данные показывают, что усиление ПОЛ происходит уже на ранних стадиях солевого стресса.

Вероятным объяснением обнаруженного нами возрастания ПОЛ при освещении является светозависимое усиление генерации АФК при транспорте электронов в хлоропластах и/или при фотодыхании в пероксисомах [13]. При этом, как и в случае проведения стрессовой обработки в темноте, увеличение длительности стресса до 8 часов не вызывало дальнейшего возрастания концентрации ТБКАП, а разница между стрессированными и контрольными образцами уменьшалась.

Отсутствие усиления ПОЛ при увеличении времени обработки с 4 до 8 часов можно объяснить тем, что в клетках листа происходит индукция защитных механизмов, которые ограничивают вызванные стрессом повреждения, в частности – ПОЛ. По-видимому, активация этих механизмов требует нескольких часов, вероятно, необходимые для транскрипции стрессовых генов и синтеза защитных белков [3]. Такая модель подтверждается исследованиями, проведенными нами ранее, где было показано, что 8-ми часовой солевой стресс приводит к возрастанию активности каталазы и гваякол пероксидазы

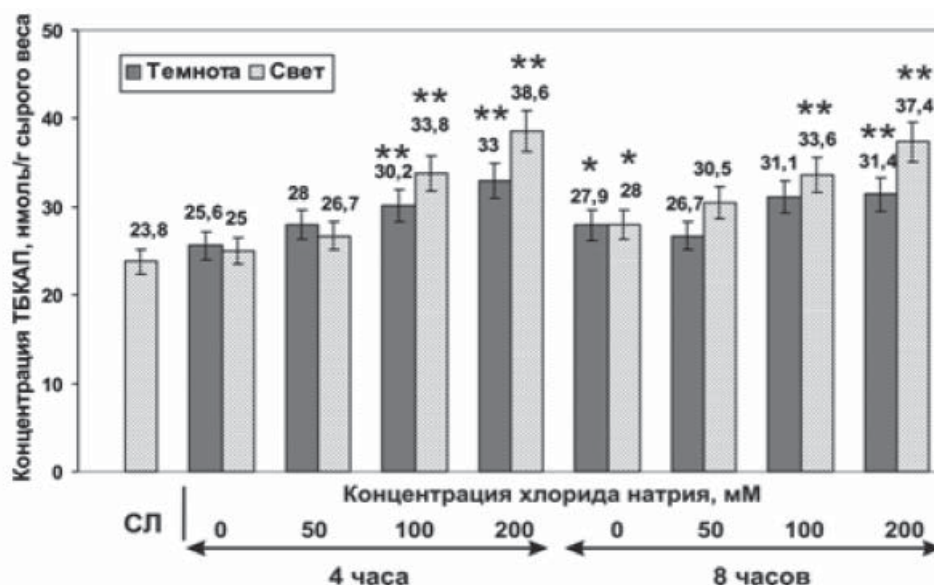


Рис. 1. Концентрация ТБКАП в листьях растений *Arabidopsis thaliana* при действии краткосрочного (4 часа) и длительного (8 часов) солевого стресса.

СЛ – свежесрезанные листья, МС – инкубация в среде Мурасиге-Скуга. Указаны средние значения, полученные для пяти независимых экспериментов и их стандартные отклонения. Разница достоверна: \* – между контрольными и интактными растениями ( $p < 0,05$ ); \*\* – между стрессированными и контрольными растениями ( $p < 0,05$ ).

– ферментов, расщепляющих пероксид водорода и тем самым снижающих интенсивность ПОЛ. Однако после 4-х часовой обработки активность этих антиоксидантных ферментов не только не возрастала, а наоборот падала [1]. Ранее также сообщалось об участии антиоксидантных ферментов в обеспечении стойкости пшеницы и свеклы к хроническому солевому стрессу [14, 5].

Таким образом, наши данные показывают, что уже на ранней стадии реакции растительной клетки на острый солевой стресс происходит усиление ПОЛ. Этот эффект более выражен на свету, что указывает на участие транспорта электронов в хлоропластах и/или фотодыхания в генерации АФК в условиях солевого стресса. При увеличении времени стрессового воздействия дополнительного возрастания ПОЛ не происходит, что связано с индукцией защитных механизмов, в частности – активацией антиоксидантных ферментов.

#### Литература

1. Буздуга І. М. та ін. Диференційна активність ізоформ каталази *Arabidopsis thaliana* за дії солевого стресу. In: Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів, 2014, т. 12, nr 2, с. 147-153.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
3. Abogadallah G. M. Antioxidative defense under salt stress. In: Plant Signal Behavior, 2010, vol. 5, p. 369-374.
4. Bagnyukova T. V. et al. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. In: Journal of Thermal Biology, 2007, vol. 32, p. 227-234.
5. Bor M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar

- beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. In: Plant Science, 2003, vol. 164, nr 1, p. 77-84.
6. de Azevedo Neto A. D. et al. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. In: Environmental and Experimental Botany, 2006, vol. 56, nr 1, p. 87-94.
7. Du Z., Bramlage W. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. In: Journal of Agricultural Food Chemistry, 1992, vol. 40, p. 1566-1570.
8. Floris M. et al. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. In: International Journal of Molecular Sciences, 2009, vol. 10, nr 7, p. 3168-3185.
9. Hernandez M. et al. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. In: Journal of Experimental Botany, 2010, vol. 61, nr 2, p. 521-535.
10. Hirayama T., Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post genome era: past, present and future. In: Plant Journal, 2010, vol. 61, nr 6, p. 1041-1052.
11. Miller, G. A. D. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. In: Plant, cell and environment, 2010, vol. 33, nr 4, p. 453-467.
12. Orendi G. Expression von Katalasen während der Blattseneszens und unter verschiedenen Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Dissertation. Verlag Grauer, 2001. 135 s.
13. Panchuk I. et al. Engineering of new plants cultivars with improved abiotic stress tolerance. In: Annals of the Stefan cel Mare University of Suceava, 2007, vol. 6, nr 1, p. 25-35.
14. Sairam R. K., Srivastava G. C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. In: Plant Sciences, 2002, vol. 162, nr 6, p. 897-904.
15. Sanchez D. H. et al. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic response to salinity. In: Physiologia Plantarum, 2008, vol. 132, nr 2, p. 209-219.
16. Seckin B. et al. The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). In: Environmental and Experimental Botany, 2010, vol. 69, nr 1, p. 76-85.
17. Yamane K. et al. Salinity induced subcellular accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaves of rice. In: Protoplasma, 2012, vol. 249, p. 301-308.
18. Yao S. et al. Plant growth and responses of antioxidants of *Chenopodium album* to long-term NaCl and KCl stress. In: Plant growth regulator, 2010, vol. 60, nr 2, p. 115-125.
19. Zhu J.-K. Plant salt tolerance. In: Trends Plant Sciences, 2001, vol. 6, nr 2, p. 66-71.

### Abstract

#### ***The influence of acute salt stress on lipid peroxidation in Arabidopsis thaliana.***

*Soil salinity causes a number of dysfunctions in plants at the cellular level and is one of the major reasons for the decline of crop productivity. The aim of the study was to characterize lipid peroxidation in Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia 0) leaves under stress caused by the rapid increase of sodium chloride concentration in the leaf tissues. An increased lipid peroxidation was demonstrated already 4 hours after the onset of stress, i.e. at the early stages of plant cell response to acute salt stress. This effect depends on the concentration of sodium chloride used for the treatment and is more pronounced under light than in the dark. This indicates that the electron transport in the chloroplasts and/or photorespiration are involved in the generation of active forms of oxygen under salt stress. The increase of treatment duration does not lead to a further elevation of lipid peroxidation, which is caused by the induction of protective mechanisms, in particular by the activation of antioxidant enzymes.*

**Keywords:** salt stress, active forms of oxygen, lipid peroxidation, *Arabidopsis thaliana*.

Черновицкий госуниверситет им. Ю. Федьковича, Украина