

ВПЛИВ ХЛОРИДУ НАТРІЮ НА ВМІСТ АСКОРБАТУ У *ARABIDOPSIS THALIANA*

I. М. БУЗДУГА, I. I. 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

Засолення ґрунтів належить до головних факторів, що лімітують продуктивність рослинництва. Зростання вмісту солей (в першу чергу – хлориду натрію) у рослинному організмі викликає сольовий стрес, одним з проявів якого є посилене утворення активних форм кисню (АФК) у хлоропластах та пероксисомах. Останнє є наслідком закриття продихів, зниження доступності CO₂ та інгібування реакції циклу Кальвіна, що в свою чергу призводить до надвідновлення електрон-транспортного ланцюга хлоропластів та активації фотодихання. АФК окислюють молекули білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, порушують проникливість плазматичних мембран та редокс гомеостаз клітини. Ключову роль в запобіганні ушкоджень окисного характеру відіграють низькомолекулярні антиоксиданти, зокрема – аскорбат (вітаміну С), який приймає участь у захисті рослин від оксидативного стресу за дії посухи, озону, інтенсивного освітлення тощо. Проте, роль аскорбату на ранній стадії відповіді рослинної клітини на сольовий стрес все ще залишається недостатньо з'ясованою. Тому у даній роботі ми зосередили увагу на вивченні змін вмісту відновленої (Asc) та окисленої (DHA) форм вітаміну С у модельній рослині *Arabidopsis thaliana* у відповідь на стрес, викликаний швидким надходженням хлориду натрію у тканини листків. 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. Було встановлено, що у контрольних рослинах, які інкубувались у темряві протягом 4 та 8 годин на живильному середовищі без додавання хлориду натрію вміст Asc знижувався, відповідно, на 19 та 13%, а вміст DHA зростав на 61 та 48%. Внаслідок цього сумарний пул Asc+DHA залишався таким же, як в інтактних рослинах, хоча частка окисленої форми зростала. При проведенні стресової обробки на світлі у контрольних зразках спостерігалось зниження вмісту Asc порівняно з інтактними рослинами, як це було і в умовах темряви. Проте, вміст DHA при цьому не збільшувався. Обробка хлоридом натрію у темряві не призводила до змін концентрації Asc у листках через 4 години, а через 8 годин за дії 200 мМ NaCl спостерігалось зменшення вмісту Asc на 15%. Сумарний пул Asc+DHA зменшувався на 24%. При освітленні вміст Asc залишався без змін через 4 години, проте вміст DHA у порівнянні з контрольними зразками знижувався. Через 8 годин при використанні 200 мМ NaCl спостерігалось зменшення вмісту Asc на 18%, а DHA – на 19%. Таким чином, отримані нами результати свідчать, що перенесення листків арабідопсису на живильне середовище по-різному впливає на вміст Asc та DHA залежно від умов освітлення. Сольовий стрес призводить до виснаження пулу Asc+DHA у листках арабідопсису. Цей ефект спостерігається вже на ранній стадії стресу як у темряві, так і при освітленні. Зменшення пулу Asc+DHA залежить від тривалості стресу та від концентрації хлориду натрію, використаного для обробки рослин.

Ключові слова: аскорбат (Asc), дегідроаскорбат (DHA), низькомолекулярні антиоксиданти, активні форми кисню (АФК), сольовий стрес, *Arabidopsis thaliana*.

Вступ. Останнім часом серед стресів абіотичної природи все більшу увагу дослідників привертає сольовий стрес, оскільки засолення ґрунтів належить до головних факторів, що лімітують продуктивність рослинництва (Abogadallah et al., 2010; Gupta et al., 2014; Zhang et al., 2012).

Сольовий стрес призводить до виникнення в рослинних клітинах осмотичного шоку (Ahmad et al., 2012; Deinlein et al., 2014), який спричиняє порушення водного балансу, зниження тургору,

пригнічення фотосинтезу тощо. (Gupta et al., 2014). За впливу сольового стресу відбувається посилене утворення активних форм кисню (АФК), які окислюють молекули білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, порушують проникливість плазматичних мембран та редокс гомеостаз клітини (Baxter et al., 2014; Choudhury et al., 2017; Dietz et al., 2016).

Ключову роль в запобіганні ушкоджень окисного характеру відіграють ферментативні і неферментативні системи дезактивації АФК (Das

et al., 2014; Reczek et al., 2015). Зокрема, низькомолекулярні антиоксиданти – аскорбат, глутатіон (γ -глутаміл-L-цистеїнілглутамін, GSH), токоферолі, каротиноїди, антоціаніни – представлені у всіх субклітинних компартментах рослинної клітини.

Аскорбат (L-аскорбінова кислота, вітамін С) та ферменти його метаболізму є важливими компонентами системи антиоксидантного захисту. Аскорбат – багатофункціональна сполука. Він відіграє важливу роль в процесах фотосинтезу, росту, а також є субстратом або кофактором ряду ферментів (Gallie, 2013).

Аскорбат в першу чергу розглядають як сполуку, що має протекторні властивості (Foyer and Noctor, 2011; Gallie, 2013). Він бере участь у детоксикації H_2O_2 в аскорбат-глутатіоновому циклі, безпосередньо реагує із супероксидними аніон-радикалами, синглетним киснем і гідроксильними радикалами (Das et al., 2014). У клітині існує у двох формах – відновленій, або саме аскорбат (Asc), та окисненій – дегідроаскорбат (DHA). Разом з цитохромами а і с, піримідинами та флавіновими нуклеотидами та глутатіоном аскорбат формує відновну систему, яка регулює окисно-відновний потенціал клітини. Asc необхідний для регенерації β -токоферолу, основною функцією якого є захист мембран клітини від перекисного окислення ліпідів та інших видів оксидативного ушкодження (Gallie, 2013; Foyer and Noctor, 2011).

Встановлено, що Asc відіграє важливу роль в захисті рослин від оксидативного стресу, який є наслідком посухи, дії озону, інтенсивного освітлення тощо (Foyer and Noctor, 2011; Zechmann, 2011; Gallie, 2013). Проте, роль аскорбату у відповіді рослин на сольовий стрес все ще залишається недостатньо з'ясованою. Зокрема, недослідженими залишаються роль аскорбату на ранній стадії сольового стресу. Тому у даній роботі ми зосередили увагу на вивченні змін вмісту відновленої (Asc) та окисленої (DHA) форм вітаміну С у модельній рослині *Arabidopsis thaliana* у відповідь на стрес, викликаний швидким надходженням хлориду натрію у тканини листків.

Об'єкти та методи. Для дослідження впливу хлориду натрію використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia 0 віком 4,5-5 тижнів, що росли у ґрунті. Рослини вирощували за сталої температури $+20^\circ\text{C}$ 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. Після цього зразки інкубували за умов освітлення або темряви за температури 20°C протягом 4 та 8 годин. Концентрацію хлориду натрію та час обробки підбирали у попередніх експериментах. Контрольні рослини інкубували на середовищі 0,5x MS без додавання хлориду натрію. Як додатковий контроль використовували інтактні рослини, які заморожували у рідкому азоті безпосередньо після зрізання.

Визначення вмісту Asc та DHA здійснювали за методом, описаним в літературі (Luwe et al., 1993). До 150-200 мг розтертого в рідкому азоті рослинного матеріалу додавали 450-600 мкл 2М $HClO_4$ та центрифугували за 13000 g протягом 15 хв. 300 мкл отриманого супернатанту переносили у чисті мікроцентрифужні пробірки та нейтралізували до рН 5,7 додаванням 1,25 М K_2CO_3 . Паралельно готували холосту пробу, що містила 2М $HClO_4$ та 1,25 М K_2CO_3 в такому ж співвідношенні. Після цього проби центрифугували за 13000 g протягом 10 хв. Отриманий супернатант розділяли на дві частини. В одній з них визначали вміст відновленої форми аскорбату, а в другій – DHA.

Визначення вмісту Asc базувалось на його окисненні до DHA за участі аскорбат оксидази (AsOX) та спостереженні змін оптичної щільності проби за довжини хвилі 265 нм. Дослідна проба містила 940 мкл 100 мМ К-фосфатного буферу (рН 5,7), 50 мкл екстракту або холостої проби та 10 мкл (10д.) AsOX (Sigma, USA). Оптичну щільність проби вимірювали безпосередньо після додавання AsOX та через 3 хв.

Вміст DHA визначали, порівнюючи оптичну щільність проби до і після відновлення DHA до Asc в присутності DTT. Реакційна проба містила 910 мкл 100 мМ К-фосфатного буферу (рН 5,7), 40 мкл 30 мМ DTT та 50 мкл екстракту або холостої проби. Оптичну щільність проби вимірювали безпосередньо після додавання супернатанту до реакційної суміші та через 1,5 год інкубування за кімнатної температури. Вміст Asc та DHA виражали у мкМ в перерахунку на кг сирової маси листків рослин *A. thaliana*.

Кожний експеримент 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 зміни вмісту Asc у листках *A. thaliana* за дії хлориду натрію у темряві.

Було встановлено, що у контрольних рослинах, які інкубувались на живильному середовищі без додавання хлориду натрію вміст Asc знижувався на 19 та 13% через 4 та 8 годин, відповідно (рис. 1А). Натомість вміст ДНА у цих точках зростав на 61 та 48% (рис. 2А). Внаслідок цього сумарний пул Asc+ДНА залишався таким же, як в інтактних рослинах, хоча частка окисленої форми зростала.

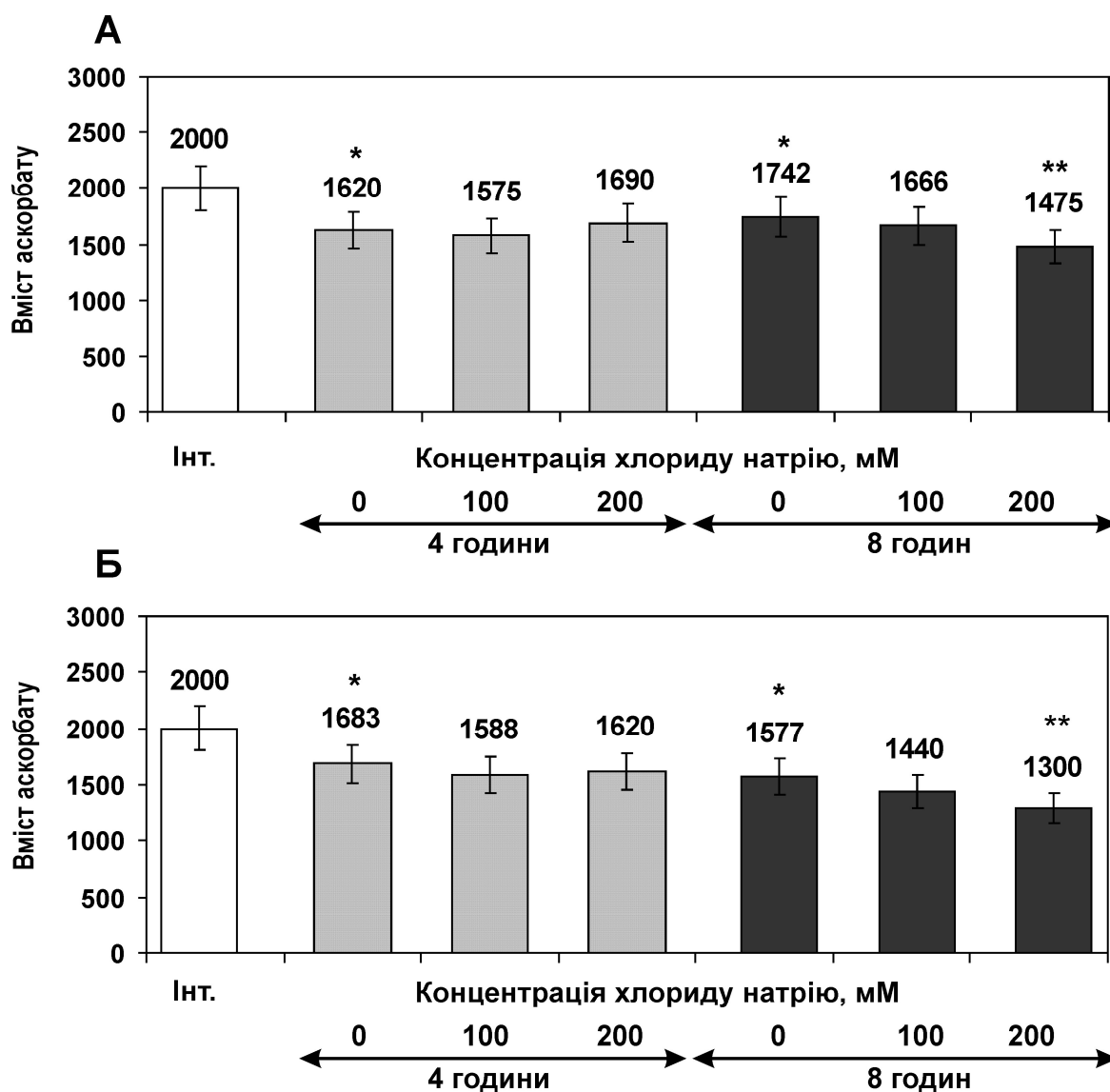


Рис. 1. Вміст аскорбату (мкмоль/кг сирової маси) у листках *Arabidopsis thaliana* за дії 100 та 200 мМ хлориду натрію протягом 4 та 8 годин. А – темрява, Б – світло.

Примітка: * - різниця у порівнянні з інтактними рослинами достовірна; ** - різниця у порівнянні з контрольними рослинами достовірна ($p < 0,05$).

Fig. 1. Ascorbate content (µM/kg fresh weight) in *Arabidopsis thaliana* leaves upon 100 and 200 mM NaCl treatment for 4 and 8 hours. A – dark, Б – light

Note: * - the difference compared to intact plants is significant ($p < 0,05$); ** - difference compared to control plants is significant ($p < 0,05$).

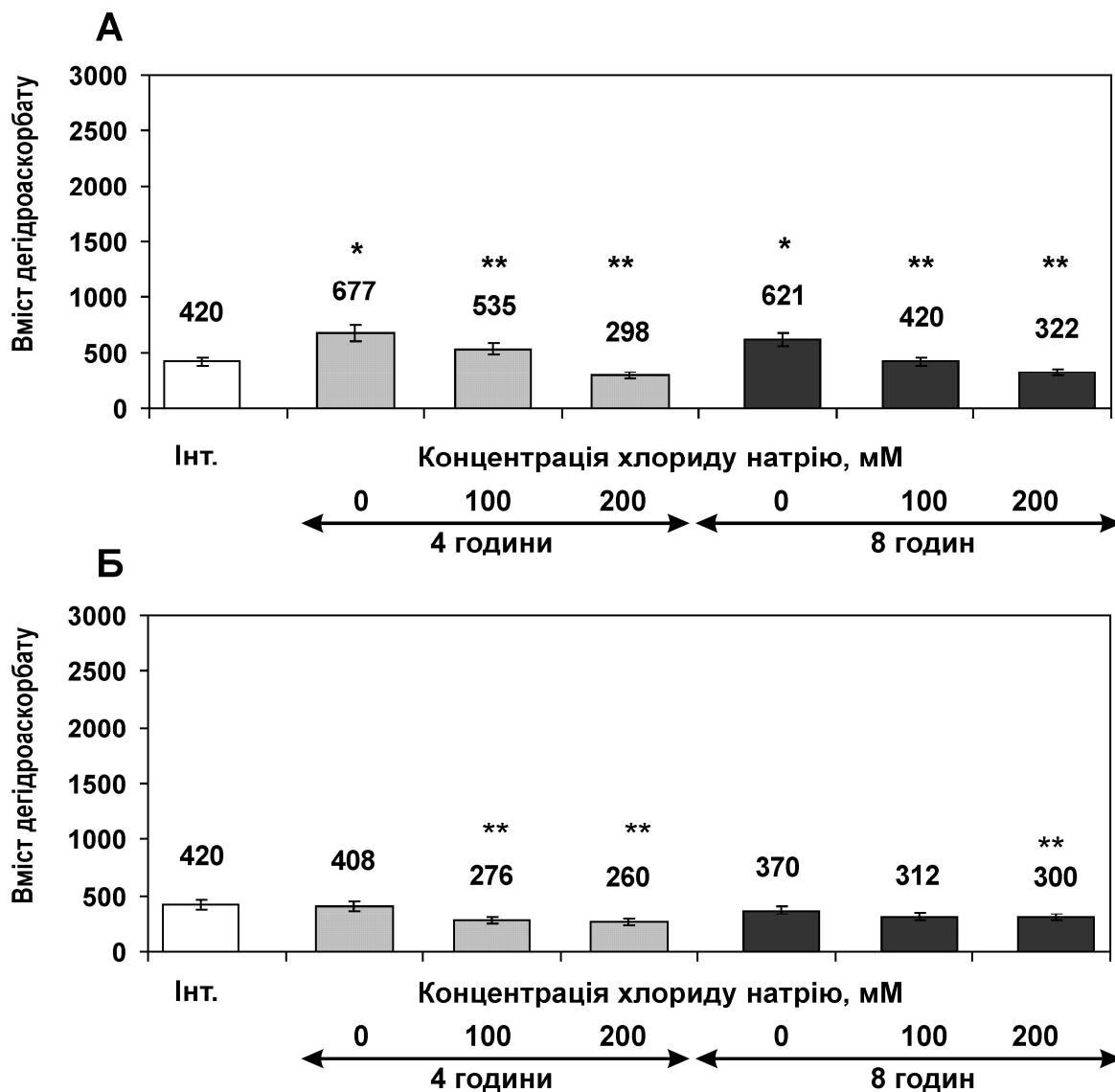


Рис. 2. Вміст дегідроаскорбату (DHA) (мкмоль/кг сирої маси) у листках *Arabidopsis thaliana* за дії 100 та 200 мМ хлориду натрію протягом 4 та 8 годин. А – темрява, Б – світло.

Примітка: * - різниця у порівнянні з інтактними рослинами достовірна; ** - різниця у порівнянні з контрольними рослинами достовірна ($p < 0,05$).

Fig. 2. Dehydroascorbate content ($\mu\text{M}/\text{kg}$ fresh weight) in *Arabidopsis thaliana* leaves upon 100 and 200 mM NaCl treatment for 4 and 8 hours. A – dark, Б – light.

Note: * - the difference compared to intact plants is significant ($p < 0,05$); ** - difference compared to control plants is significant ($p < 0,05$).

Обробка хлоридом натрію протягом 4 годин не призводила до змін концентрації аскорбату у листках. Проте вміст ДНА у порівнянні з контрольними зразками знижувався на 21% в присутності 100 мМ хлориду натрію та 56% – у присутності 200 мМ. Після 8 годинної обробки спостерігалось зменшення вмісту Asc на 15% лише за дії найвищої концентрації (200 мМ). Вміст ДНА знижувався аналогічно як і за 4 годинної обробки. При цьому сумарний пул Asc+DHA зменшувався на 24%.

При проведенні стресової обробки на світлі у контрольних зразках спостерігалось зниження вмісту Asc порівняно з інтактними рослинами (рис.

1Б), як це було і в умовах темряви. Проте, вміст ДНА при цьому не збільшувався (рис. 2Б).

При освітленні вміст Asc залишався без змін через 4 години дії хлориду натрію не залежно від його концентрації. Натомість вміст ДНА знижувався на 32 та 36% в присутності 100 та 200 мМ NaCl, відповідно. Продовження стресової обробки до 8 годин з використанням 200 мМ NaCl призводило до зменшення вмісту Asc на 18%, а ДНА – на 19% порівняно з контрольною групою рослин. Водночас, сумарний пул Asc+DHA зменшувався на 18%.

Таким чином, отримані нами результати свідчать, що перенесення листків арабідопсису на живильне середовище по-різному впливає на вміст

Asc та DHA залежно від умов освітлення. У темряві протягом 8 год спостерігалось лише часткове окислення Asc до DHA, але подальшого окислення DHA не відбувалось. Завдяки цьому сумарний пул Asc+DHA практично не змінювався. Цікаво, що при збільшенні тривалості обробки з 4 до 8 год. окислення Asc не зростало, а навіть зменшувалось, що може свідчити про адаптацію листків арабідопсису до умов темряви.

На противагу цьому при освітленні у контрольних зразках відбувалось зниження вмісту Asc без зростання вмісту DHA, що призводило до зменшення сумарного пулу Asc+DHA, причому цей ефект підсилювався при збільшенні часу обробки. Нагадаємо, що у фотосинтезуючих клітинах до 90% АФК генеруються у хлоропластах як наслідок перенесення електронів та у пероксисомах при фотодиханні (Asada, 2006; Moller et al., 07). Інше кажучи, у темряві генерується значно менше АФК, ніж при освітленні. Водночас, синтез Asc є світлозалежним процесом (Szarka et al., 2012). Проте, отримані дані вказують, що при інкубації листків арабідопсису на живильному середовищі при освітленні (на відміну від темряви) синтез *As de novo* або його регенерація з DHA неспроможні повністю компенсувати окислення, що і призводить до поступового виснаження пулу Asc+DHA.

Нами було також встановлено, що за умов сольового стресу виснаження пулу Asc+DHA підсилюється залежно від часу обробки та застосованої концентрації хлориду натрію. Цей ефект пов'язаний в першу чергу із підсиленням окислення DHA. Зменшення вмісту аскорбату після проведення стресової обробки при освітленні було не більшим, ніж у темряві. Цей результат видається дещо несподіваним, оскільки вважається, що сольовий стрес підсилює саме світлозалежну генерацію АФК у хлоропластах та пероксисомах. Останнє є наслідком закриття продихів, зниження доступності CO₂ та інгібування реакцій циклу Кальвіна, що в свою чергу призводить до надвідновлення електрон-транспортного ланцюга хлоропластів та активації фотодихання (Abogadallah, 2010; Miller et al., 2010).

Раніше було встановлено, що обробка арабідопсису хлоридом натрію у концентрації 200 мМ протягом 48 год. призводить до суттєвого зниження вмісту аскорбату (Huang et al., 2005). Отримані нами результати свідчать, що перші ознаки виснаження пулу Asc+DHA (а отже – виникнення вторинного окисативного стресу) спостерігаються вже через кілька годин від початку сольового стресу. Причиною розвитку окисативного стресу видається зростання внутрішньоклітинної концентрації хлориду натрію, яке призводить до підсиленої генерації АФК (Abogadallah, 2010; Miller et al., 2010).

Нещодавно нами було показано, що за дії 200 мМ хлориду натрію протягом 8 годин у листках арабідопсису відбувається зростання на 23% активності дигідроаскорбат редуктази (DHAR) – ферменту, що бере участь у підтримці пулу відновленого аскорбату в клітині (Буздуга та ін., 2017). В той же час, активність іншого ферменту аскорбат-глутатіонового циклу – аскорбатпероксидази, навпаки знижувалась на 16-20%, що також мало би протидіяти виснаженню пулу Asc (Діденко та інші, 2015). Також відомо, що мутантні лінії *A. thaliana vtc1* та *vtc2*, які є більш чутливими до сольового стресу, мають знижений базовий вміст аскорбату та за тривалої дії хлориду натрію демонструють суттєві втрати аскорбату в мітохондріях (67%), пероксисомах (68%) і цитозолі (38%) (Huang et al. 2005; Koffler et al., 2015). Отже, складається враження, що підтримка окисно-відновної рівноваги у рослинній клітині (зокрема – збереження пулу Asc+DHA) є важливим елементом клітинної відповіді на дії сольового стресу. Порушення цієї рівноваги та активація захисної клітинної відповіді відбуваються вже на ранній стадії сольового стресу.

Висновки. Сольовий стрес призводить до виснаження пулу Asc+DHA у листках арабідопсису. Цей ефект спостерігається вже на ранній стадії стресу як у темряві, так і при освітленні. Зменшення пулу Asc+DHA залежить від тривалості стресу та від концентрації хлориду натрію, використаного для обробки рослин.

Список літератури

1. Буздуга І.М., Гаврилук І.Г., Панчук І.І. Активність DHAR у рослин *Arabidopsis thaliana* за дії сольового стресу // Біологічні системи. – 2017. – Т. 9, Вип. 1. – С. 11–18.
2. Буджак В.В. Біометрія – Чернівці: Рута. – 2013. – 326 с.
3. Діденко Н. О., Буздуга І. М., Волков Р. А, Панчук І. І. Активність аскорбат та гваякол пероксидаз у нокаутного мутанта *cat2 Arabidopsis thaliana* за дії сольового стресу // Вісн. УТГіС. – 2015. – Т 13, № 1. – С. 34–38.
4. Abogadallah G.M. Antioxidative defense under salt stress // Plant Signal. Behav. – 2010. –5(4). – P. 369–374. doi: 10.4161/psb.5.4.10873
5. Ahmad P., Prasad M. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability // Plant Science. – 2012. – Vol. 8. – P. 149–156. doi: 10.1007/978-1-4614-0634-1_3
6. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplast and their functions // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141. – P. 391-396. doi: 10.1104/pp.106.082040
7. Baxter A., Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling // J. Exp. Botany. – 2014. – Vol. 65. – P. 1229–1240. doi:10.1093/jxb/ert375

8. Caverzan A., Casassola A., Brammer S. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plants tolerance to stress // *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives* / edited by Arun K. Shanker and Chitra Shanker. – InTech, 2016. – P. 463–474. doi: 10.5772/61368
9. Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // *Plant J.* – 2017. – Vol. 90, № 5. – P. 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
10. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // *Front. Environ. Sci.* – 2014. – Vol. 2. – P. 1–13. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053
11. Deinlein U., Stephan A., Horie T., et al. Plant salt-tolerance mechanisms // *Trends Plant Sci.* – 2014. – Vol. 19. – P. 371–379. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.001
12. Dietz K.J., Turkan I., Krieger-Liszkay A. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast // *Plant Physiol.* – 2016. – Vol. 171. – P. 1541–1550. doi: 10.1104/pp.16.00375
13. Foyer C., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 155. – P. 2–18. doi: 10.1104/pp.110.167569
14. Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth // *J. Exp. Botany.* 2013. Vol. 64. – P. 433–443. doi: 10.1093/jxb/ers330
15. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // *Int. J. Genomics.* – 2014. – P. 1–18. doi: 10.1155/2014/701596
16. Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P., Zhang L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant // *J. Exp. Botany.* – 2005. – Vol. 56. – P. 3041–3049. doi: 10.1093/jxb/eri301
17. 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. – Vol. 58. – P. 8–16. doi: 10.1007/s12374-014-0264-1
18. Luwe M., Takahama U., Heber U. Role of ascorbate in detoxify in ozone in the appoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 101, Is.3. – P. 969–976.
19. Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses // *Plant Cell Environ.* – 2010. – Vol. 33. – P. 453–467. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
20. Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants // *Annu Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58. – P. 459–481. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
21. Reczek C., Chandel N. ROS-dependent signal transduction // *Cur. Opin. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 8–13. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.010
22. Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G. The ascorbate glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13. – P. 4458–83. doi: 10.3390/ijms13044458
23. Zhang H., Han B., Wang T., Chen S., Li H., Zhang Y., Dai S. Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics // *J. Proteome Res.* – 2012. – Vol. 11. – P. 49–67. doi: 10.1021/pr200861w
24. Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. 360–363. doi: 10.4161/psb.6.3.14342

References

1. Buzduha I.M., Havryljuk I.G., Panchuk I.I. The activity of DHAR in *Arabidopsis thaliana* under salt stress // *Biological systems.* – 2017. – Vol. 9, Is. 1. – P. 11–18. (In Ukrainian).
2. Budhzak V.V. *Biometrics – Chernivtsi: Ruta.* – 2013. – 326 p. (In Ukrainian).
3. Didenko N.O., Buzduga I.M., Volkov R. A., Panchuk I.I. Activity of ascorbate and guaiacolperoxidases in *Arabidopsis thaliana cat2* knockout mutants under salt stress. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.* – 2015. – Vol. 13, Is. 1. – P. 34–38.
4. Abogadallah G.M. Antioxidative defense under salt stress // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – Vol. 5, Is. 4. – P. 369–374. doi: 10.4161/psb.5.4.10873
5. Ahmad P., Prasad M. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability // *Plant Science.* – 2012. – Vol. 8. – P. 149–156. doi: 10.1007/978-1-4614-0634-1_3
6. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplast and their functions // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 391–396. doi: 10.1104/pp.106.082040
7. Baxter A., Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling // *J. Exp. Botany.* – 2014. – Vol. 65. – P. 1229–1240. doi:10.1093/jxb/ert375
8. Caverzan A., Casassola A., Brammer S. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plants tolerance to stress // *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives* / edited by Arun K. Shanker and Chitra Shanker. – InTech, 2016. – P. 463–474. doi: 10.5772/61368
9. Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination // *Plant J.* – 2017. – Vol. 90, № 5. – P. 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299
10. Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants // *Front. Environ. Sci.* – 2014. – Vol. 2. – P. 1–13. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053
11. Deinlein U., Stephan A., Horie T., et al. Plant salt-tolerance mechanisms // *Trends Plant Sci.* – 2014. – Vol. 19. – P. 371–379. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.001
12. Dietz K.J., Turkan I., Krieger-Liszkay A. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast // *Plant Physiol.* – 2016. – Vol. 171. – P. 1541–1550. doi: 10.1104/pp.16.00375

13. Foyer C., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 155. – P. 2–18. doi: 10.1104/pp.110.167569
14. Gallie D.R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth // *J. Exp. Botany.* 2013. Vol. 64. – P. 433–443. doi: 10.1093/jxb/ers330
15. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // *Int. J. Genomics.* – 2014. – P. 1–18. doi: 10.1155/2014/701596
16. Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P., Zhang L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant // *J. Exp. Botany.* – 2005. – Vol. 56. – P. 3041–3049. doi: 10.1093/jxb/eri301
17. 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. – Vol. 58. – P. 8–16. doi: 10.1007/s12374-014-0264-1
18. Luwe M., Takahama U., Heber U. Role of ascorbate in detoxify in ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 101, Is.3. – P. 969–976.
19. Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses // *Plant Cell Environ.* – 2010. – Vol. 33. – P. 453–467. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
20. Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants // *Annu Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58. – P. 459–481. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
21. Reczek C., Chandel N. ROS-dependent signal transduction // *Cur. Opin. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 8–13. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.010
22. Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G. The ascorbate glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13. – P. 4458–83. doi: 10.3390/ijms13044458
23. Zhang H., Han B., Wang T., Chen S., Li H., Zhang Y., Dai S. Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics // *J. Proteome Res.* – 2012. – Vol. 11. – P. 49–67. doi: 10.1021/pr200861w
24. Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. 360–363. doi: 10.4161/psb.6.3.14342

EFFECT OF SODIUM CHLORIDE ON THE ASCORBATE CONTENT IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

I. M. Buzduha, I. I. Panchuk

*Soil salinization is one of the main factors limiting the productivity of crop production. The increase of salt (primarily sodium chloride) content in the plants causes saline stress, one of the manifestations of which is the elevated formation of reactive oxygen species (ROS) in chloroplasts and peroxisomes. This is due to the closure of stomata, the decreased CO₂ availability and the inhibition of Calvin cycle reactions, which in turn leads to over-reduction of the electron transport chain components in the chloroplasts and activation of photorespiration. ROS oxidize the molecules of proteins, lipids, nucleic acids, disrupt the permeability of the plasma membranes and the redox homeostasis of the cell. Low molecular weight antioxidants, in particular ascorbate (vitamin C), play a key role in preventing oxidative damage. Ascorbate protects plants from oxidative stress elicited by drought, ozone, intensive lighting, etc. However, the role of ascorbate in the early stage of the plant cell response to saline stress is still not clear enough. Therefore, in this paper, we study the changes in the content of the reduced (Asc) and oxidized (DHA) forms of vitamin C in the model plant *Arabidopsis thaliana* in response to stress caused by the rapid flow of sodium chloride into the leaf tissues. 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 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. It was found that in control plants incubated in the dark for 4 and 8 hours in medium without added sodium chloride, Asc content decreased by 19% and 13%, respectively, and the DHA content increased by 61% and 48%. As a result, the total Asc + DHA pool remained the same as in intact plants, but the proportion of the oxidized form increased. The content of Asc decreased under light conditions in control samples compared to intact plants, as was the case in darkness. However, DHA content did not increase. Treatment with sodium chloride in the dark did not result in changes in Asc concentration in the leaves after 4 hours. After 8 hours Asc content decreased by 15% in the 200 mM NaCl treatment. The total pool of Asc + DHA decreased by 24%. Asc content remained unchanged after 4 hours of stress treatment in light conditions. The DHA content was lower compared to control samples. After 8 hours of treatment with 200 mM NaCl, there was a decrease in Asc content by 18% and DHA by 19%. Thus, the results obtained indicate that the transfer of *Arabidopsis* leaves to the nutrient medium has different effects on the content of Asc and DHA depending on the lighting conditions. Salt stress leads to the depletion of the Asc + DHA pool in the leaves of *Arabidopsis*. This effect is already observed at an early stage of stress, both in the dark and under illumination. The decrease of the Asc + DHA pool depends on the duration of stress and the concentration of sodium chloride used for plant treatment.*

Key words: ascorbate (Asc), dehydroascorbate (DHA), antioxidants, reactive oxygen species (ROS), salt stress, Arabidopsis thaliana.

Отримано редколегією 14.11.2017
Biological systems. Vol. 9. Is. 2. 2017