

УДК 577.152.1+577.218

АКТИВНІСТЬ ГВАЯКОЛПЕРОКСИДАЗИ У НОКАУТНОЇ ЛІНІЇ КО-*Cat2* *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА УМОВ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ

Т.О. РУСНАК, І.М. ДОЛБА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
58012 Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

Досліджено зміни активності гваяколпероксидази (POD) у відповідь на тепловий стрес у рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу (екотип Columbia 0) і в нокаутної за геном каталази 2 (*Cat2*) мутантної лінії КО-*Cat2*, яка має знижену каталазну активність. Встановлено, що в інтактних листках мутантних рослин, інкубованих у буфері за кімнатної температури в темряві, активність POD зростала й компенсувала втрату ізоформи CAT2, проте відмінностей між активностями POD у рослин дикого типу й мутантів, які росли у ґрунті за оптимальних умов, не виявлено. Під дією помірного теплового стресу (37 °С) порівняно з кімнатною температурою активність POD підвищувалась за дії двогодинної обробки у рослин дикого типу й односторонньої — у лінії КО-*Cat2*. Отже, залучений у відповідь на тепловий стрес фермент бере участь у контролі внутрішньоклітинного рівня пероксиду водню. Проте в умовах жорсткого теплового стресу (44 °С) захисна функція POD може обмежуватись частковою інактивацією ферменту.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, тепловий стрес, каталаза, гваяколпероксидаза, ізоферменти.

Температура є одним із чинників навколишнього середовища, який істотно впливає на рослини. Підвищення температури понад оптимальний рівень порушує швидкість ферментативних реакцій у клітині, а подальше її зростання супроводжується денатурацією багатьох білків, що призводить до метаболічного дисбалансу й загибелі [26]. Відповідно клітинна реакція на дію теплового стресу пов'язана зі швидким синтезом захисних білків теплового шоку, більша частина яких є молекулярними шаперонами, здатними стабілізувати інші білки й захищати їх від денатурації [18].

Іншим аспектом теплового стресу є збільшення продукції в клітині активних форм кисню (АФК), зокрема пероксиду водню, що може спричинити вторинний оксидативний стрес [12, 15, 18]. Молекула пероксиду водню найстабільніша серед представників АФК; вона порівняно легко проникає крізь мембрани й пошкоджує біомолекули на значній відстані від місця свого утворення [17]. Доведено також, що в *Arabidopsis thaliana* L. в умовах помірного теплового стресу пероксид водню відіграє роль сигнальної молекули і необхідний для ефективною активації експресії генів, які кодують білки теплового шоку, зокрема HSP17.6, HSP18.2, та антиоксидантний фермент аскорбатпероксидазу 2 (APX2) [19].

Рівень АФК у клітині контролюється антиоксидантними системами, які включають низькомолекулярні антиоксиданти й антиоксидантні

ферменти [17]. У рослин у розщепленні пероксиду водню беруть участь каталази (CAT) і пероксидази, а саме: аскорбатпероксидази (APX) та «класичні» гваяколпероксидази (POD) [21, 22, 24]. Ці ферменти представлені в рослинній клітині кількома ізоформами. Наприклад, у сім'ядолях соняшника виявлено вісім ізоформ CAT [11], у *A. thaliana* та *Zea mays* — по три [13, 21]. Серед ізоформ CAT *A. thaliana* найбільш експресованою є CAT2, на яку припадає 70 % загальної каталазної активності у тканинах мезофілу листків.

Мультигенна родина APX у *A. thaliana* складається з восьми ізоформ [19], POD кодується значно більшою кількістю генів, яких є щонайменше 73 у *A. thaliana* та 138 у *Oryza sativa*. Кодовані цими генами білки виявлено в апопласті, клітинній стінці, вакуолях, цитозолі [24]. POD каталізують реакції, де пероксид водню є акцептором електронів і бере участь в окисненні різних субстратів, зокрема фенолів та ароматичних амінів [1, 17].

У наших попередніх дослідженнях встановлено, що тепловий стрес активує в *A. thaliana* транскрипцію генів, які належать до родини APX. Зокрема, APX2 схарактеризовано як білок теплового шоку нешаперонової природи і висунуто припущення щодо його участі у захисті рослини від термоокислативного стресу [20]. Пізніше було доведено, що цей ген відіграє важливу роль у забезпеченні виживаності *A. thaliana* за дії підвищених температур [16]. На противагу цьому набагато менше відомо про участь у забезпеченні термотолерантності рослин інших ферментів, які розщеплюють пероксид водню, зокрема каталази і гваяколпероксидази.

Питання взаємодії між різними ферментними системами, роль окремих ізоформ у забезпеченні стійкості до стресу, здатність окремих білків замінювати один одного протягом розвитку стресової реакції все ще залишаються недостатньо дослідженими. Для прояснення ролі окремих ізоформ CAT у захисті від теплового стресу та перевірки припущення, чи може POD компенсувати втрату активності окремих ізоформ CAT і брати участь у стресовій реакції ми дослідили зміни активності POD у листках *A. thaliana* дикої типу (ДТ) та в мутантній лінії KO-*Cat2* за дії підвищених температур.

Методика

Дослідження проводили на семитижневих рослинах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. екотипу Columbia 0 (дикий тип) та нокаутної мутантної лінії KO-*Cat2* (SALK 057998), отриманої з колекції NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, University of Nottingham, Велика Британія). Ця нокаутна лінія містить інсерцію T-ДНК у кодувальній ділянці гена каталази *Cat2*, що призводить до повної втрати його експресії.

Рослини вирощували в ґрунті за постійної температури 20 °С й освітлення 2,5 клк в умовах 16-годинного світлового дня та відносної вологості повітря 60—70 %. Після 6,5 тижня температуру вирощування підвищували до 28 °С і продовжували культивувати рослини ще 48 год. У наших попередніх дослідженнях встановлено, що такий режим культивування посилює клітинну відповідь арабідопсису на тепловий стрес [20].

Для стресової обробки відбирали по 5—6 лише добре розвинених листків із середньої частини розетки; наймолодші та найстаріші листки не використовували. Рослинні зразки обробляли на термостатованій во-

даний бані в конічних скляних колбах об'ємом 100 мл, в які вміщували по 10–15 листків і наливали по 25 мл інкубаційного буферу (1 мМ калій-фосфатний буфер, рН 6,0).

Теплову обробку рослин проводили в темряві протягом 1, 2 і 4 год за температури +37 та +44 °С. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазу постстресової репарації, через 1 і 2 год після початку стресової обробки зразки переносили в камеру, де підтримували оптимальну для рослин температуру +20 °С і продовжували інкубацію відповідно протягом 1 і 2 год. Контролем слугували зразки, інкубовані протягом зазначеного часу в темряві за температури +20 °С.

Після завершення обробки рослинний матеріал заморожували в рідкому азоті й зберігали у морозильній камері за температури –70 °С для подальших досліджень. Як додатковий контроль використовували інтактні листки, заморожені безпосередньо після відокремлення від рослини.

Білки екстрагували в буфері, що складався із 50 мМ натрій-фосфату (рН 7,0), 0,25 мМ ЕДТА, 10 % гліцерину, 2 % полівінілпіролідону-25 та 1 мМ аскорбату (AsA).

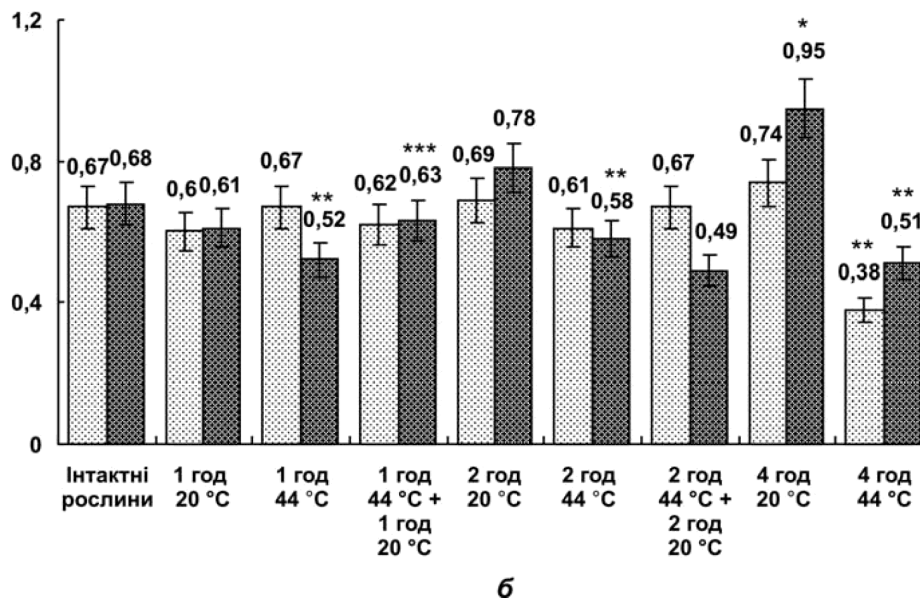
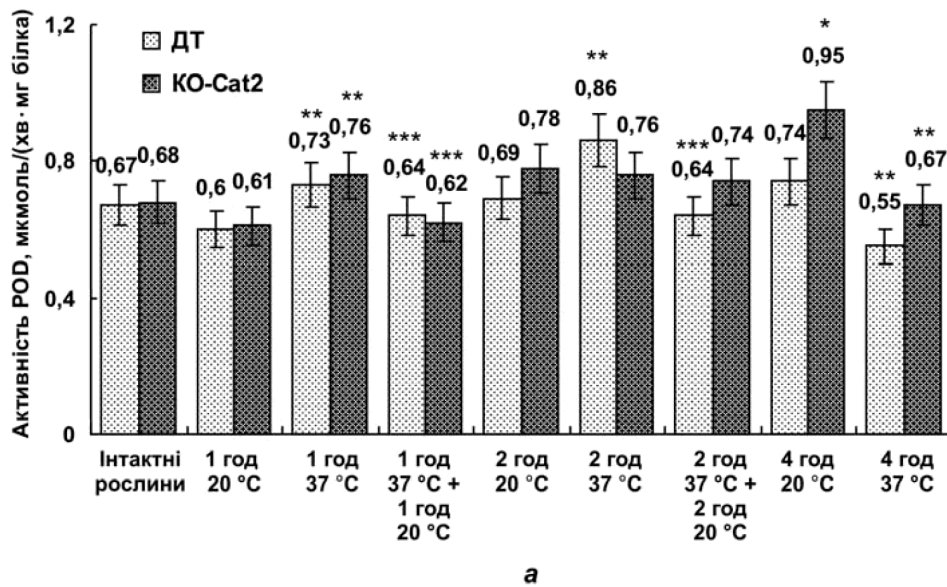
До 200 мкл охолодженого екстракційного буфера додавали 100 мг замороженого рослинного матеріалу, гомогенізували й центрифугували протягом 10 хв за 15 000 g і температури +4 °С; після цього відбирали надосадову рідину та зберігали її на льоду до визначення активності POD.

Загальну активність POD визначали спектрофотометрично вимірюванням зміни оптичної густини проби за довжини хвилі 470 нм [9]. Реакційна проба (1 мл) містила 25 мкл білкового екстракту і 975 мкл реакційної суміші, що складалась із 25 мМ натрій-ацетатного буфера (рН 5,0), 8 мМ гваяколу, 9 мМ H₂O₂. Активність ферменту виражали в мікромолях субстрату, розщепленого за 1 хв, в перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [10]. Всі експерименти повторювали для п'яти незалежно вирощених партій рослин. Кожне вимірювання ферментної активності проводили у 3–4 паралельних пробах. Статистичну вірогідність отриманих результатів оцінювали з використанням двовибіркового *t*-критерію для залежних вибірок [6].

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень порівнювали активність POD в інтактних рослин ДТ і КО-*Cat2*, які не піддавали стресовій обробці. Встановлено, що порівнювані лінії практично не відрізнялись за активністю POD (рисунк, а).

У наших попередніх дослідженнях виявлено, що в нокаутної лінії КО-*Cat2* повністю відсутня активність ізоформи САТ2, але ця втрата частково компенсується додатковою активацією ізоформи САТ3. Втім загальна каталазна активність у листках нокаутних рослин знижена і становить 58 % рівня активності у рослин ДТ. При цьому активність АРХ незначно зростала у рослин нокаутної лінії, які культивували за нестресових умов [2]. Отримані нами нові дані свідчать, що подібно до АРХ активність POD також не зростала, тобто досліджені пероксидази — АРХ і POD — за нестресових умов не беруть участі в компенсації втрати САТ2. Незважаючи на те що рослини КО-*Cat2* мають знижену здатність розщеплювати пероксид водню, згідно з нашими попередніми даними



Гваяколпероксидазна активність (мкмоль/(мг білка · хв)) у листках рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу та нокаутної лінії KO-Cat2 за дії помірної (а, 37 °C) і жорсткого (б, 44 °C) теплового стресу. *Різниця вірогідна: між контрольними та інтактними рослинами ($p < 0,05$); **між підданими стресу й контрольними рослинами ($p < 0,05$); ***між підданими стресу рослинами й рослинами у фазу післястресового відновлення ($p < 0,05$)

рівень пероксидного окиснення ліпідів мембран у них не підвищувався [3]. Отже, у KO-Cat2 активуються інші механізми, які компенсують втрату активності ізоформи CAT2.

Оскільки тепловий стрес призводить до зростання рівня пероксиду водню в *A. thaliana* [19], було досліджено, чи змінюється активність POD у рослин, підданих тепловій обробці. Встановлено, що помірний (37 °C)

тепловий стрес протягом 1 год порівняно з контролем (інкубація за кімнатної температури) спричинював підвищення активності POD на 22 % у рослин ДТ і на 25 % у КО-*Cat2* (див. рисунок, а). За двогодинної помірної теплової обробки активність POD зростала лише у рослин ДТ, а в КО-*Cat2* залишалась на рівні контрольних значень. Подальша стресова обробка рослин (4 год, 37 °С) призводила до зниження активності POD на 26 % у рослин ДТ і на 29 % — у мутантної лінії.

За дії жорсткого теплового стресу (44 °С) характер змін активності POD в обох досліджених ліній арабідопсису відрізнявся від такого за дії помірної стресової обробки (див. рисунок, б). У рослин ДТ активність POD після жорсткого стресу протягом 1 і 2 год практично не змінювалась, але через 4 год обробки за 44 °С активність ферменту знижувалась на 49 % порівняно з контролем.

На протигагу рослинам ДТ у КО-*Cat2* лінії інактивація POD за дії жорсткого стресу розпочиналась раніше: вже через 1 год активність ферменту знижувалась на 15 %. З подовженням теплової обробки до 2 і 4 год активність ферменту знижувалась відповідно на 26 і 46 % порівняно зі значеннями, зафіксованими для контрольних зразків. Імовірним поясненням зниження активності POD може бути інактивація ферменту в умовах теплового стресу за відсутності достатнього компенсаторного синтезу нових молекул. На користь такого пояснення свідчить те, що максимальне зниження активності POD спостерігалось за найтривалішої обробки (4 год), причому за 44 °С фермент інактивувався сильніше, ніж за 37 °С.

Попередньо ми дослідили вплив теплового стресу на арабідопсис ДТ із застосуванням інкубаційного буфера, що додатково містив 1 % цукрози [8]. Встановлено, що після обробки листків протягом 2 год за 37 °С активність POD зростала на 27 %, за 44 °С — на 16 %. Статистично вірогідне зниження активності ферменту не спостерігалось у жодному з варіантів досліду. Отже, склалось враження, що цукроза здатна відігравати роль стабілізатора активності POD за умов теплового стресу. Проте це питання потребує детальніших досліджень.

Згідно з отриманими результатами, POD у *A. thaliana* є відносно термолабільним білком, який може поступово інактивуватись за дії жорсткого теплового стресу. Проте POD — термостабільніший фермент, ніж APX, активність якої за дії 4-годинного жорсткого теплового стресу зменшується на 69 % у рослин ДТ екотипу Columbia 0 і на 88 % — у еко-типу С24 [4, 20] навіть при проведенні інкубації листків за наявності 1 % цукрози.

Слід зазначити, що результати, отримані для *A. thaliana*, відрізняються від раніше отриманих нами даних для кукурудзи [7]. Зокрема показано, що інкубація листків *Zea mays* в умовах жорсткого теплового стресу (44 °С) протягом 2 год зумовлювала зростання активності POD приблизно на 60 %, тоді як помірний тепловий стрес не викликав істотних змін активності POD. Відмінність у стресовій реакції цих видів можна розглядати як елемент адаптації кукурудзи до теплішого клімату.

У фазу одногодинної репарації після помірного теплового стресу (1 год, 37 °С + 1 год, 20 °С) у рослин ДТ і КО-*Cat2* відмічено зниження активності POD до рівня рослин, інкубованих за кімнатної температури. Це може бути пов'язано з нормалізацією рівня пероксиду водню у клітинах листків. На стадії двогодинного відновлення після двогодинного помірного стресу активність POD у ДТ була нижчою порівняно з групою

рослин, що зазнали дії двогодинного теплового стресу. Проте у КО-*Cat2* активність POD на стадії відновлення не зменшувалась, що вказує на затримку в роботі репаративних механізмів у мутанта.

У фазу одногодинного відновлення після одногодинної жорсткої теплової обробки у ДТ активність POD не змінювалась. Нагадаємо, що в цьому варіанті теплового стресу (1 год, 44 °С) активність POD залишалась на рівні значень контрольних рослин, інкубованих протягом 1 год за 20 °С (див. рисунок, б). Інакше кажучи, у ДТ ані стресова обробка протягом 1 год за 44 °С, ані наступне відновлення протягом 1 год за 20 °С не викликали статистично вірогідних змін активності POD. Інша картина спостерігалась для лінії КО-*Cat2*: після одногодинного відновлення відмічено зростання активності POD на 21 % порівняно з рослинами зі зниженим рівнем активності цього ферменту внаслідок обробки за 44 °С протягом 1 год.

У фазу двогодинного постстресового відновлення як у рослин ДТ, так і нокаутної лінії КО-*Cat2* не виявлено вірогідних змін активності POD порівняно з рослинами, інкубованими за температури 44 °С.

Слід зауважити, що в контрольних зразках рослин КО-*Cat2*, інкубованих за нестресової температури протягом 1, 2 і 4 год, виявлено тенденцію до зростання активності POD порівняно з інтактними рослинами. Унаслідок цього різниця між значеннями активності у ДТ і КО-*Cat2* поступово збільшувалась і ставала статистично вірогідною.

Відомо, що в рослин POD є функціонально лабільним ферментом, який реагує на порушення клітинного гомеостазу за дії різноманітних стресорів. Пероксидазна активність підвищувалась за впливу водного дефіциту, високої й низької температур, механічних пошкоджень, у процесі старіння, при патогенезі [5, 14, 23, 25]. Диференційні зміни в наборах ізоферментів за дії низько- і високотемпературного стресу виявлено у злаків [5, 7].

Отримані нами результати підтверджують, що в нокаутних КО-*Cat2* рослин арабідопсису можливе активування POD, що компенсує відсутність ізоформи CAT2. Проте таке активування має місце лише за певних умов (у нашому випадку — за інкубації в темряві при 20 °С), тоді як у листках рослин, що зростали в ґрунті в умовах кліматичної камери, активність POD у ДТ і КО-*Cat2* була однаковою.

Крім того, в *A. thaliana* індукція POD спостерігається на ранній стадії (1–2 год) відповіді на дію помірного теплового стресу. В умовах тривалішої дії (4 год) жорсткого теплового стресу захисна функція POD може ослаблюватись унаслідок часткової інактивації ферменту. Механізми, що впливають на стабільність POD в умовах теплового стресу, потребують додаткового вивчення.

1. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. — 2006. — 46. — С. 303–322.
2. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність каталази та аскорбатпероксидази у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* за дії іонів кадмію // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2011. — 9, № 2. — С. 200–209.
3. Доліба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *Cat2* нокаутного мутанту *Arabidopsis thaliana* // Там само. — 2012. — 10, № 1. — С. 13–19.
4. Доліба І.М., Руснак Т.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Підвищена активність аскорбат пероксидази у подвійного мутанта *Arabidopsis thaliana* за генами *Cat2* та *Cat3* // Там само. — 2011. — 9, № 1. — С. 3–9.
5. Капустян А.В., Кучеренко В.П., Панюта О.О. Активність пероксидази та зміна її ізоферментних форм за умов низькотемпературного стресу // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — 36, № 1. — С. 55–63.

6. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
7. Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність пероксидази проростків кукурудзи в умовах теплового стресу // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 1. — С. 1—6.
8. Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А., Панчук І.І. Температурнозалежна активність гваяколпероксидази у АРХ2 нокаут-мутантів арабідопсису // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — **6**, № 2. — С. 275—281.
9. Amako K., Chen G., Asada K. Separate assays for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. — 1994. — **35**. — P. 497—504.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
11. Eising R., Trelease R.N., Ni W. Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons // Arch. Biochem. Biophys. — 1990. — **278**. — P. 258—264.
12. Fedoroff N. Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses // Ann. Bot. — 2006. — **98**. — P. 289—300.
13. Frugoli J., Nuccio M. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. — 1996. — **112**. — P. 327—336.
14. Garcia-Lara S., Arnason J.T., Diaz-Pontones D. et al. Soluble peroxidase activity in maize endosperm associated with maize weevil resistance // Crop. Sci. — 2007. — **47**. — P. 1125—1130.
15. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. — 2010. — **48**. — P. 909—930.
16. Larkindale J., Vierling E. Core genome responses involved in acclimation to high temperature // Plant Physiol. — 2008. — **146**. — P. 748—761.
17. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. — 2004. — **9**. — P. 490—498.
18. Nobuhiro S., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiol. plant. — 2006. — **126**. — P. 45—51.
19. Panchuk I.I., Volkov R.A., Mullineaux P.M., Schoeffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. — 2006. — **61**. — P. 733—746.
20. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schoeffl F. Heat stress — and HSF-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2002. — **129**. — P. 838—853.
21. Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression / J.G. Scandalios (ed.) Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. — N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. — P. 343—406.
22. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**. — P. 1305—1319.
23. Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes // Functional Plant Biol. — 2005. — **32**. — P. 45—53.
24. Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* // Gene. — 2002. — **288**. — P. 129—138.
25. Veljovic-Jovanovic S., Kukavica B., Stevanovic B. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica* // J. Exp. Bot. — 2006. — **57**. — P. 1759—1768.
26. Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. Heat tolerance in plants: An overview // Environ. Exp. Bot. — 2007. — **61**. — P. 199—223.

Отримано 05.07.2012

АКТИВНОСТЬ ГВАЯКОЛПЕРОКСИДАЗЫ У НОКАУТНОЙ ЛИНИИ КО-*Cat2* *ARABIDOPSIS THALIANA* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛООВОГО СТРЕССА

Т.А. Руснак, И.Н. Долиба, Р.А. Волков, И.И. Панчук

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича

Изучены изменения активности гваяколпероксидазы (POD) в ответ на тепловой стресс у растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа (экотип Columbia 0) и нокаутной по гену каталазы 2 (*Cat2*) мутантной линии КО-*Cat2*, которая имеет пониженную каталазную активность.

АКТИВНОСТЬ ГВАЯКОЛПЕРОКСИДАЗЫ У НОКАУТНОЙ ЛИНИИ

Установлено, что в интактных листьях мутантных растений, которые инкубировались в буфере при комнатной температуре в темноте, активность POD возрастала и компенсировала потерю изоформы CAT2, однако отличия активностей POD у растений дикого типа и мутантов, которые росли в почве при оптимальных условиях, не обнаружены. Под воздействием умеренного теплового стресса (37 °C) по сравнению с комнатной температурой активность POD повышалась после двухчасовой обработки у растений дикого типа и одночасовой — у линии KO-*Cat2*. Следовательно, фермент вовлечен в ответ на тепловой стресс путем участия в контроле внутриклеточного уровня пероксида водорода. Однако в условиях жесткого теплового стресса (44 °C) защитная функция POD может быть ограничена частичной инактивацией фермента.

GUAIACOL PEROXIDASE ACTIVITY IN *Cat2* KNOCK-OUT MUTANT OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UPON HEAT STRESS TREATMENT

T.O. Rusnak, I.M. Doliba, R.A. Volkov, I.I. Panchuk

Yuri Fedkovych Chernivtsi National University
2 Kotsiubynskoho St., 58012 Chernivtsi, Ukraine

Changes in guaiacol peroxidase (POD) activity upon heat stress were evaluated in wild type plants of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia 0) and in catalase 2 (*Cat2*) knock-out mutant KO-*Cat2*, which demonstrates reduced catalase activity. It was found that in leaves of the mutant plants incubated in buffer at room temperature in dark activity of POD was increased compensating the lack of CAT2 isoform. However, no differences in POD activity were found between the wild type and mutant plants growing on soil at non-stressful conditions. Upon moderate (37 °C) heat treatment comparing to room temperature activity of POD was increased during 2 hours in wild type and during 1 hour in KO-*Cat2* plants. Accordingly, the enzyme appears to be involved in heat stress response via the control of intracellular level of hydrogen peroxide. However, upon severe (44 °C) heat stress the protective function of POD can be limited due to partial inactivation of the enzyme.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, heat stress, catalase, guaiacol peroxidase.