УДК 576.3+58.02+52-423

РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ У ВІДПОВІДІ *ARABIDOPSIS THALIANA* НА УМОВИ СИМУЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА УЧАСТЬ АУТОФАГІЇ В ОПОСЕРЕДКУВАННІ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ

С.Г. ПЛОХОВСЬКА, Р.Ю. ШАДРІНА, О.А. КРАВЕЦЬ, А.І. ЄМЕЦЬ, Я.Б. БЛЮМ *

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна

E-mail: blume.yaroslav@nas.gov.ua

Досліджено роль оксиду азоту (NO) у відповіді рослин на умови симульованої мікрогравітації. Встановлено, що обробка насіння Arabidopsis thaliana донором NO нітропрусидом натрію (SNP), стимулюючи зміни ростових параметрів коренів, призводить до підвищення стійкості рослин до кліностатування. Після обробки насіння SNP вміст ендогенного NO (у відповідності до вмісту нітритів) у контрольних рослин на 6-ту добу культивування підвищувався у 1,5 рази, у кліностатованих у 1,8 рази. На 9–12 добу вміст ендогенного NO поступово знижувався, що може свідчити про адаптацію рослин до умов кліностатування. За допомогою специфічного флуоресцентного зонда DAF-FM DA виявлено підвищення рівня флуоресценції NO в епідермальних клітинах апексів коренів та кореневих волосках у кліностатованих рослин, що свідчить про накопичення ендогенного NO в цих тканинах кореня за умов стресу. На 6 добу вирощування за умов кліностатування, порівняно з контрольними рослинами, виявлено збільшення накопичення аутофагосом в епідермальних клітинах перехідної зони кореня з наступним зменшенням цього показника на 9–12 добу. Обробка насіння скавенджером NO cPTIO незначно пригнічувала ріст проростків, і цей ефект посилювався за умов кліностатування, включаючи значне зростання накопичення аутофагосом в епідермальних клітинах. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що регулювання вмісту ендогенного NO є важливою складовою внутрішньоклітинних механізмів сигналінгу, які залучаються до відповіді клітин рослин на симульовану мікрогравітацію.

Ключові слова: *симульована мікрогравітація, кліностатування, оксид азоту (NO), донори NO, нітропрусид натрію (SNP), скавенжери NO, cPTIO, аутофагія.*

Вступ. Оксид азоту (NO) – сигнальна молекула, залучена до регуляції різноманітних процесів у рослин: від проростання насіння, їх росту та розвитку до цвітіння та дозрівання плодів (Khan et al, 2021). Крім того, NO як сигнальна молекула відіграє ключову роль у відповіді рослин на дію біотичних та абіотичних стресових чинників. Зокрема, NO підвищує стійкість рослин до таких стресів як посуха, засолення, УФ-В випромінювання, вплив важких металів, високих та низьких температур (Cassia et al, 2019; Fancy et al, 2017; Krasylenko et al, 2012, 2017; Lytvyn et al, 2016; Mohd Amnan et al, 2021; Plohovska et al, 2019; Yemets et al, 2015). Продемонстровано, що при ураженні рослин патогенами відбувається вивільнення молекул NO, що вказує про їх залучення у регуляцію стійкості до хвороб (Nasir et al, 2020).

Виявлено, що етилен, кальцій, цАМФ, а також активні форми кисню (АФК) та NO являються найпершими сигнальними компонентами у відповідній реакції на зміну сили тяжіння (Gilroy et al, 2016). Раніше повідомлялося про роль NO та АФК як месенджерів у гравітропічній відповіді шляхом впливу на перерозподіл ауксину в рослині (Mugnai et al, 2014). Для підтвердження цієї гіпотези коріння проростків кукурудзи піддавали впливу параболічної та опосередкованої мікрогравітації. В результаті було виявлено залучення ауксину, АФК та NO до формування гравітропної відповіді (Mugnai et al, 2014). NO може брати участь у механізмах регуляції апоптозу клітин, в тому числі, при дії мікрогравітації. Наприклад, у листках каланхое, що зазнали впливу імітованої мікрогравітації (1 об/хв) виявили збільшення кількості апоптичних клітин, що безпосередньо корелювало з рівнем NO (Pedroso and Durzan, 2000). Результати досліджень ролі NO у локалізації білка PIN2 та транспорті ауксину при гравітропічній реакції вказують на залучення NO як важливого компоненту відповіді рослин на гравітацію (París et al, 2018).

NO також може регулювати функції білків через посттрансляційні модифікації, зокрема S-нітрозилювання (Yun et al, 2011) або

© С.Г. ПЛОХОВСЬКА, Р.Ю. ШАДРІНА, О.А. КРАВЕЦЬ, А.І. ЄМЕЦЬ, Я.Б. БЛЮМ, 2022

нітротирозилювання (Blume et al, 2013). Автори останніх досліджень щодо ролі NO в сигнальних шляхах відповіді рослинної клітини на зміну сили тяжіння припускають, що саме S-нітрозилювання цистеїну може відігравати основну роль при цьому виді стресу (Kruse and Wyatt, 2022). Відомо, що за умов мікрогравітації відбувається підвищення або зниження рівнів експресії значної кількості генів, залучених до участі в багатьох клітинних процесах, включаючи загальний метаболізм, кальцієвий та ліпідний сигналінги, синтез білків та клітинної стінки (Correll et al, 2013; Paul et al, 2013).

Показано, що різні абіотичні стреси (голодування, УФ-Б опромінення, осмотичний та сольовий стрес) індукують в клітинах проростків *Arabidopsis thaliana* розвиток аутофагії, яка розглядається як внутрішньоклітинний адаптивний процес (Lytvyn et al, 2018; Olenieva et al, 2019). Відомо, що аутофагія залучена до видалення та деградації неправильно згорнутих білків та пошкоджених органел у процесі росту та розвитку рослин (Bassham et al, 2006). Аутофагія у рослин має вирішальне значення для підтримання клітинного гомеостазу за фізіологічних умов і стимулюється при дії стресів (Chen et al, 2021). На сьогодні вивчення фізіологічної ролі аутофагії при дії стресових чинників є однією з актуальних проблем біології, оскільки в залежності від ступеня ушкодження клітин цей процес може сприяти або виживанню, або спрямовувати клітини до запрограмованої загибелі (Cao et al, 2021). Нами вперше отримано результати, які підтверджують посилення аутофагії в клітинах кореня проростків *A. thaliana,* вирощених за умов симульованої мікрогравітації (Шадріна та ін, 2019, 2020). Отримані нами дані дозволяють розглядати аутофагію як один з адаптивних механізмів виживання клітин в умовах зміненої мікрогравітації і при довготривалому стресі.

Слід зазначити, що роль NO в механізмах адаптації до мікрогравітації, включаючи аутофагію, практично не вивчена. Тому метою роботи було дослідження ролі NO в регуляції росту рослин та розвитку аутофагії за умов дії симульованої мікрогравітації за допомогою донорів та скавенджерів NO.

Матеріали та методи. Як об'єкт дослідження використовували проростки *A. thaliana* екотипу Columbia Col-0. Насіння стратифікували при температурі 4 °С впродовж доби і далі пророщували на горизонтальному кліностаті (4 об/хв) та в стаціонарних умовах (контроль) протягом 12 діб при 22 °С з фотоперіодом 14/10 год (день/ніч) та освітленні 4000 люкс. Для вивчення впливу NO на проростання та ріст проростків як екзогенний донор NO використовували нітропрусид натрію (SNP), який індукує синтез NO, а як скавенджер − 2-(4-карбоксифеніл)-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (cPTIO), хімічна дія якого базується на окисленні NO до NO^{2-}. Як у випадку донора, так і скавенджера NO їх використовували в концентраціях 100, 200, 500 та 1000 мкМ. Насіння окремо витримували у водних розчинах SNP та cPTIO протягом 24 год, стерилізували (10 % NaOCl), відмивали стерильною дистильованою водою та висаджували на живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС). Пророщування насіння, культивування проростків, а також дослідження впливу мікрогравітації на ріст та морфологію коренів проводили згідно раніше описаних нами методик (Шадріна та ін, 2020, Yemets at al, 2021). Зокрема, ріст та розвиток проростків аналізували на 4-ту, 6-ту та 8-му добу вирощування за допомогою цифрової фотокамери Canon Power Shot G6, довжину коренів підраховували за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d). Для кожного досліджуваного показника було визначено його середнє значення та стандартне відхилення від середнього значення в межах однієї вибірки. Усі дослідження проводили не менше, ніж у трьох повторах.

Вміст NO у кліностатованих проростків визначали за стандартною методикою з модифікаціями (Zhang et al, 2018). В основу цього методу покладене кількісне визначення нітриту за допомогою реактиву Грісса після утворення нітриту з ендогенного NO. З цією метою наважку свіжозрізаного рослинного матеріалу 100 мг гомогенізували в рідкому азоті, додавали 1 мл дистильованої види і нагрівали на водяній бані (98 °С) впролдовж 1 хв та охолоджували на льоду. Далі гомогенат освітлювали центрифугуванням 10 хв при 6000 об/хв. та додавали 0,5 мл реактиву Грісса (1%-ний розчин в 12%-ній оцтовій кислоті). Через 30 хв визначали світлопоглинання розчину за допомогою спек-

трофотометра (SPECORD 210) при довжині хвилі 540 нм, використовуючи розчини нітриту натрію як стандарти. Концентрацію нітритів (мкг/мл) розраховували за формулою: X = A/V, де A – вміст нітритів, знайдений на калібрувальному графіку (мкг); V – об'єм проби, взятої для аналізу (мл).

Ріст і зміни у морфології первинних, бічних та додаткових коренів проростків *A. thaliana* за умовах мікрогравітації вивчали за допомогою світлового мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина) (об'єктиви Plan-Neofluar 10×/0.30, 20×/0.5 DIC). Внутрішньоклітинну локалізацію NO у коренях визначали, використовуючи флуоресцентний зонд 4-аміно-5-метиламіно-20,70-дифторфлуоресцеїн діацетат (DAF-FM DA). Для цього проростки *A. thaliana* інкубували в розчинні DAF-FM (10 мкМ) при 37 °C протягом 20 хв із трикратним промиванням у PBS буфері (pH 7,4). Локалізацію NO візуалізували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина) при довжині хвилі 488 нм, емісія – 500–530 нм, об'єктив Plan Apochromat 10Ч/1.4 DIC.

Для дослідження прижиттєвої локалізації аутофагосом у клітинах, проростки *A. thaliana* обробляли барвником LysoTracker™ Red DND-99 («Invitrogen», США) в концентрації 1 мМ з подальшим трикратним відмиванням проростків у натрієво-фосфатному буфері (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 1,76 мМ KH_2PO_4, pH 7,4). Флуоресцентний сигнал фіксували за допомогою мікроскопу LSM 510 META при довжині хвилі 543 нм, емісія – 560 (long pass), об'єктив Plan Apochromat 40×/1.4 DIC. Усі експерименти проводили у трьох повторах.

Отримані дані обробляли з використанням пакетів комп'ютерних прикладних програм «Microsoft Excel 2010» та «OriginPro 2015». Статистичну обробка результатів експериментів проводили шляхом визначення середніх арифметичних величин (M), стандартної похибки (m), та величини стандартних відхилень. Достовірність і значущість міжгрупових відмінностей визначали за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA), довірчий інтервал складав 95 %, відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Попередня обробка насіння *A. thaliana* розчином SNP в концентраціях 100–500 мкМ (протягом 24 год) стимулювала як проростання насіння, так і ріст проростків та підвищувала стійкість рослин до умов мікрогравітації. Обробка SNP по різному впливала на ріст кореня проростків в контрольних умовах та за умов змін гравітації. В контрольних дослідах SNP в концентрації 100 та 500 мкМ стимулював приріст коренів на 6-ту та, особливо, 8 добу вирощування (рис. 1). У контролі приріст кореня збільшувався в межах 18 %, досягаючи максимума на 6 добу росту, особливо при використанні SNP в концентрації 500 мкМ (на 64 % відносно контролю без обробки). За умов кліностатування також було виявлено позитивний вплив донора NO, найбільший стимулюючий ефект спостерігали на 8 добу при концентрації 100 мкМ SNP (на 35 % відносно кліностатованих рослин без обробки SNP).

В результаті попередньої обробки насіння cPTIO у концентраціях 100–1000 мкМ встановлено, що цей скавенджер NO пригнічує ріст головних коренів проростків *A. thaliana*. Після обробки cPTIO у концентраціях 100–500 мкМ відбувалося незначне сповільнення росту коренів, і більш виражене – після обробки cPTIO у концентрації 1000 мкМ (рис. 1). Оскільки ріст коренів після обробки cPTIO все ж таки продовжувався, це, вірогідно, пояснюється тим, що підтримання певного внутрішньоклітинного рівня ендогенного NO може забезпечуватись постійною активністю нітратредуктазної та/або L-аргінін-залежної системи його синтезу.

В загальних рисах морфологічні показники проростків *A. thaliana* при кліностатуванні мало відрізнялися від контролю. Зокрема, кліностатовані проростки відрізнялися від контрольних дезорієнтацією росту, що було пов'язано з постійною зміною їхнього положення відносно вектора гравітації. Слід зазначити, що зона диференціації з несформованими кореневими волосками була довшою порівняно з контролем (рис. 2, *а*, *б*). Крім впливу на ріст головних коренів проростків *A. thaliana*, обробка екзогенним донором SNP спричиняла ряд змін їх морфології, що проявлялося в ініціації формування нових кореневих волосків. Так, після обробки

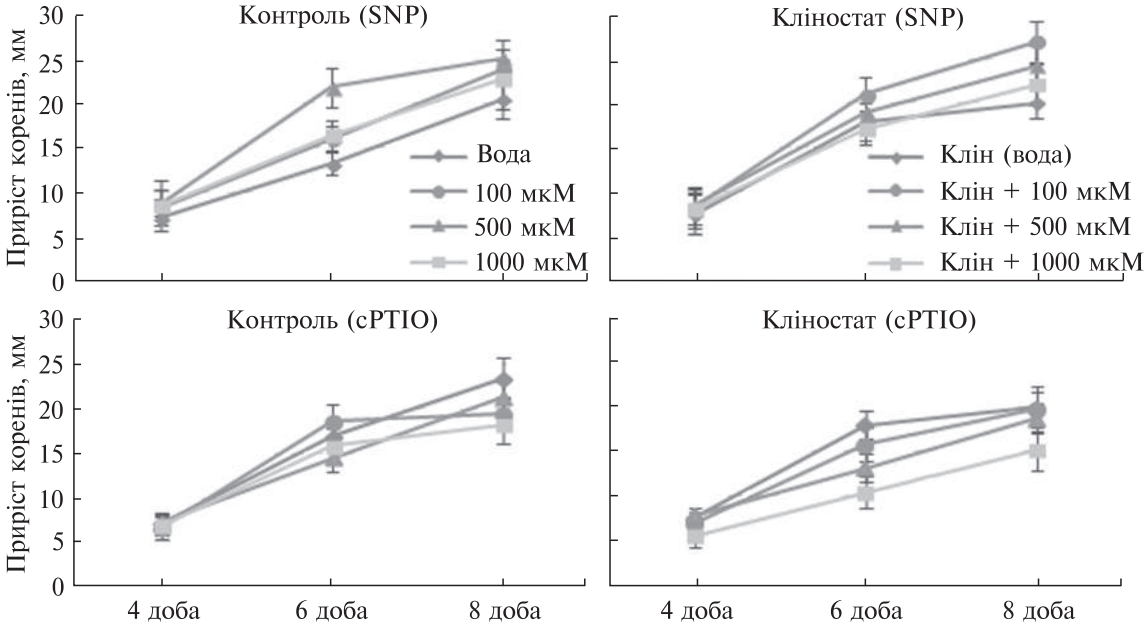

Рис. 1. Приріст головного кореня *A. thaliana* за умов кліностатування та обробки SNP/cPTIO

насіння SNP в концентрації 1000 мкМ спостерігали інтенсивне утворення нових кореневих волосків у зоні диференціації. Подібна картина спостерігалась і у кліностатованих рослин, які зазнавали обробки донором NO (рис. 2, *б*, *в*).

У контрольних рослин обробка скавенджером cPTIO (1000 мкМ) призводила до утворення зачатків численних кореневих волосків, які припиняли ріст, що було також характерно і для кліностатованих проростків. Таким чином, обробка cPTIO призводить до усунення біологічної активності ендогенного NO, що підтверджує його зв'язування зі скавенджером.

Отримані нами результати узгоджуються з результатами ряду авторів, які підтверджують важливу роль NO у процесах коренеутворення. NO також бере участь у регуляції спокою та проростання насіння (Sarath et al, 2006; Wang et al, 2020). Щодо механізмів дії, то NO може взаємодіяти з іншими гормонами і від їх взаємобалансу залежить ефект його дії. NO може впливати на метаболізм абсцизової кислоти, або на її баланс з гібереловою кислотою, що регулює спокій та активацію проростання насіння (Sarath et al, 2006; Wang et al, 2020). NO також взаємодіє з ауксином в регуляції розвитку коренів, що призводить до формування кореневих волосків, збільшуючи кількість їх зачатків, а також до подовження головного кореня за рахунок збільшення активності кореневої меристеми (Sun et al, 2018). Наприклад, коли корінь зазнає гравістимуляції, ауксин переважно транспортується в нижню частину зони розтягу, утворюючи градієнт концентрації в цій області (цим обумовлюється гальмування розтягнення клітин), що спонукає корінь згинатися вниз (Strohm et al, 2012). Асиметричний розподіл ауксину викликає серію наступних каскадних реакцій, таких як запуск, в свою чергу, асиметричного розподілу інших сигнальних молекул, зокрема NO (Hu et al, 2005).

Механізм дії NO також пов'язаний з його взаємодією з АФК, що може покращувати окислювально-відновний гомеостаз і посилювати антиоксидантну здатність клітин (Correa Aragunde et al, 2015), а також індукувати утворення токсичного аніону пероксинітриту ($ONOO^-$) (Beckman et al, 1994). На тваринних клітинах показано, що мікрогравітація індукує ангіогенез через такий сигнальний шлях: індуцибельна NO синтаза – оксид азоту – цГМФ (Siamwala et al, 2010). Умови мікрогравітації можуть збільшувати як активність антиоксидантних ферментів, так і вміст глутатіону, що є важливим механізмом у системі захисту клітини проти окисного стресу та відіграє важ-

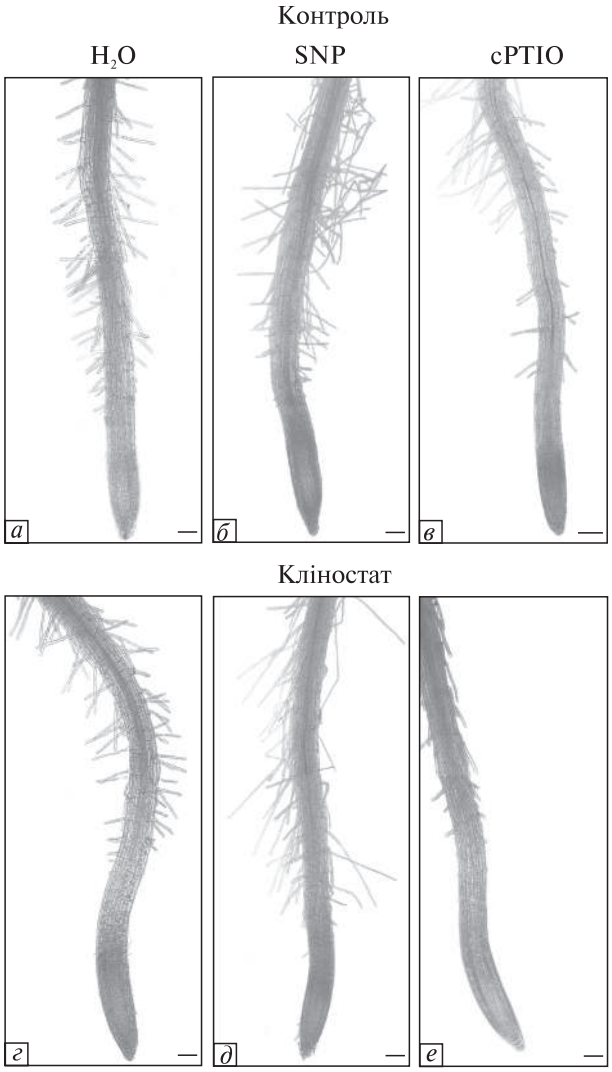

Рис. 2. Морфологія коренів проростків *A. thaliana* за умов кліностатування та обробки SNP/cPTIO (1000 мкМ): *а* – H_2O, *б* – SNP, *в* – cPTIO, *г* – кліностат, *д* – кліностат/SNP, *е* – кліностат/cPTIO. Масштаб: 10×

ливу роль у адаптації тварин до мікрогравітації (Rizzo et al, 2009; Lin and Wang, 2021).

Нами також було визначено внутрішньоклітинну концентрацію нітритів (NO_2) в кліностатованих рослинах за допомогою реакції Грісса. Концентрацію нітритів (мкг/мл) визначали в 6- та 9-добових проростках *A. thaliana*, попередньо оброблених SNP та cPTIO в концентрації 1000 мкМ. В результаті проведених досліджень було виявлено, що на 6 добу вирощування обробка SNP призводить до підвищення рівня ендогенного NO в 1,5 рази у контрольних рослин та в 1,8 рази – у кліностатованих у відповідності до вмісту нітритів (рис. 3).

На 9 добу культивування внутрішньоклітинний вміст NO поступово знижувався, що може свідчити про адаптацію рослин до впливу зміненої гравітації. Важливо зазначити, що обробка cPTIO призводила до зниження вмісту ендогенного NO, особливо за умов кліностатування. З цих умов вміст NO, індукований кліностатуванням, знижувався в межах 1,3–1,35 рази у варіанті з обробкою скавенджером NO (рис. 3).

Окрім вимірювання внутрішньоклітинної концентрації NO, нами було використано флуоресцентний барвник DAF-FM DA для визначення тканинної локалізації NO в коренях кліностатованих рослин. В результаті проведених досліджень було виявлено флуоресценцію барвника в епідермальних клітинах коренів (на 6-ту добу вирощування), більш інтенсивну за умов мікрогравітації порівняно з контролем (рис. 4). Було встановлено, що попередня обробка насіння *A. thaliana* SNP призводила до зростання інтенсивності флуоресценції NO, статистично значущого у варіанті з кліностатуванням, а обробка cPTIO – до зниження цього показника, що свідчить про зв'язування ендогенного NO з cPTIO (рис. 4).

Раніше на коренях сої було показано, що NO також бере участь у гравітропічному вигинанні кореня (Hu et al, 2005). За допомогою барвника DAF-2DA було виявлено, що гравісимуляція викликає швидке асиметричне накопичення NO в коренях, що є необхідним у відповіді на стрес. Роль NO в регуляції мікрогравітації досліджували також на ціанобактеріях *Microcystis aeruginosa* (Xiao et al, 2012), що дозволило авторам змоделювали наступну послідовність подій, які відбуваються після обробки SNP та cPTIO, в такому порядку: мікрогравітація – зміни генерації NO – підвищення концентрації NO – надпродукція продуктів NO та NO-похідних – нітрозативний стрес – негативні наслідки. Якщо SNP посилює надпродукцію NO в умовах мікрогравітації, то cPTIO, навпаки, перехоплює частину NO і опосередковано зменшує вплив токсичних продуктів, генерованих з NO (Xiao et al, 2012). Таким чином, використання ефективних донорів і ска-

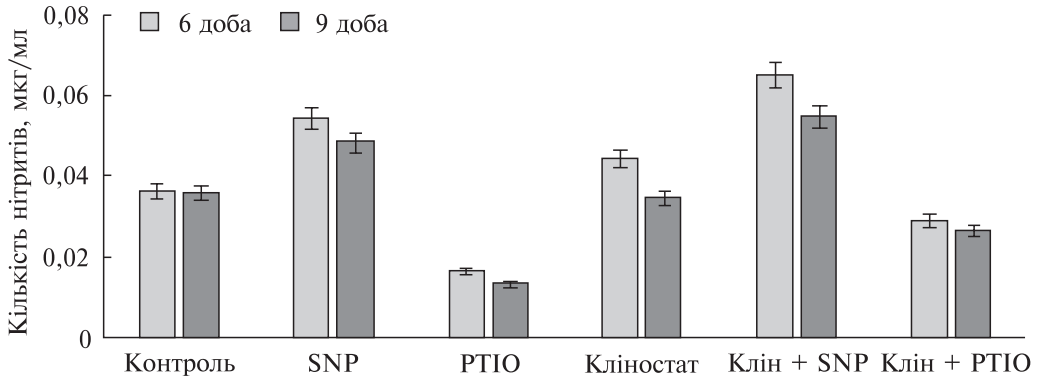

Рис. 3. Оцінка продукції NO по вмісту нітритів в проростках *A. thaliana* за умов кліностатування та обробки SNP або cPTIO

венджерів NO може бути рекомендовано для забезпечення регулювання вмісту ендогенного NO, який залучається до відповіді клітин на вплив факторів зовнішнього середовища, зокрема мікрогравітації.

Візуалізацію аутофагосом проводили на 6 добу вирощування, оскільки за попередніми даними в цей період відбувається індукція процесу аутофагії (Shadrina et al, 2020). В результаті дослідження динамічних змін аутофагії нами було виявлено внутрішньоклітинне накопичення аутофагосом на 6-ту добу вирощування та поступове зменшення їх кількості при подальшому культивуванні за умов мікрогравітації. Для з'ясування ролі NO у розвитку аутофагії використовували обробку насіння як донором, так і скавенджером NO. Згідно отриманих даних обробка SNP не призводила до суттєвих змін процесу аутофагії, порівняно з контролем. Обробка cPTIO незначно посилювала процеси аутофагії в епідермальних клітинах коренів *A. thaliana* (рис. 5).

Існує небагато досліджень про взаємозв'язок між стимульованою мікрогравітацією та NO, проведених на тваринах. Показано, що мікрогравітація може впливати на синтез NOS та вироблення NO у ссавців (Klein-Nulend et al, 2003; Xiong et al, 2003). Так, остеобласти, культивовані за умов моделюваної мікрогравітації, демонструють вищу активність NOS і підвищену продукцію NO (Klein-Nulend et al, 2003). Вплив мікрогравітації призводить до підвищення вмісту NO, а також iNOS та мРНК у серцевих міоцитах щурів, частково, як вважають, через активацію протеїнкінази C (Xiong et al, 2003). Умови мікрогравітації можуть впливати на розвиток ембріонів мишей шляхом регуляції експресії NO. Так, у культуральному середовищі за умов мікрогравітації виявлено вищий вміст NO та активність NOS, що потенційно призводить до затримки ембріонального розвитку миші та апоптозу клітин (Cao et al, 2007).

Історія досліджень NO на рослинах значно обмежена, що, власне, і вказує на актуальність та потребу в таких роботах. Відомо, що NO регулює різноманітні клітинні сигнали через S-нітрозилювання специфічних залишків цистеїну білків (Zhan et al, 2018). Внутрішньоклітинний рівень S-нітрозоглутатіону (GSNO), основного біологічно активного виду NO, регулюється GSNO-редуктазою (GSNOR), яка є головним регулятором сигналінгу NO. Раніше було продемонстровано, що S-нітрозилювання викликає селективну аутофагію в клітинах *A. thaliana* у відповідь на кисневе голодування. S-нітрозилювання GSNOR1 по залишку Cys-10 індукує конформаційні зміни через залучення білків, які кодують білок ATG8. Після зв'язування з білком ATG8 GSNOR1 компартменталізується в аутофагосомах і деградує. Отже, вказаний механізм демонструє фізіологічну залежність селективної аутофагії та індуковане S-нітрозилюванням GSNOR1 у зв'язку з гіпоксією, тим самим встановлюючи молекулярний зв'язок між NO-сигналінгом та аутофагією (Zhan et al, 2018).

В умовах зміненої мікрогравітації рівень GSNOR знижений в порівнянні з наземним контролем, але рівні транскрипту цього білка залишаються постійними, що свідчить про

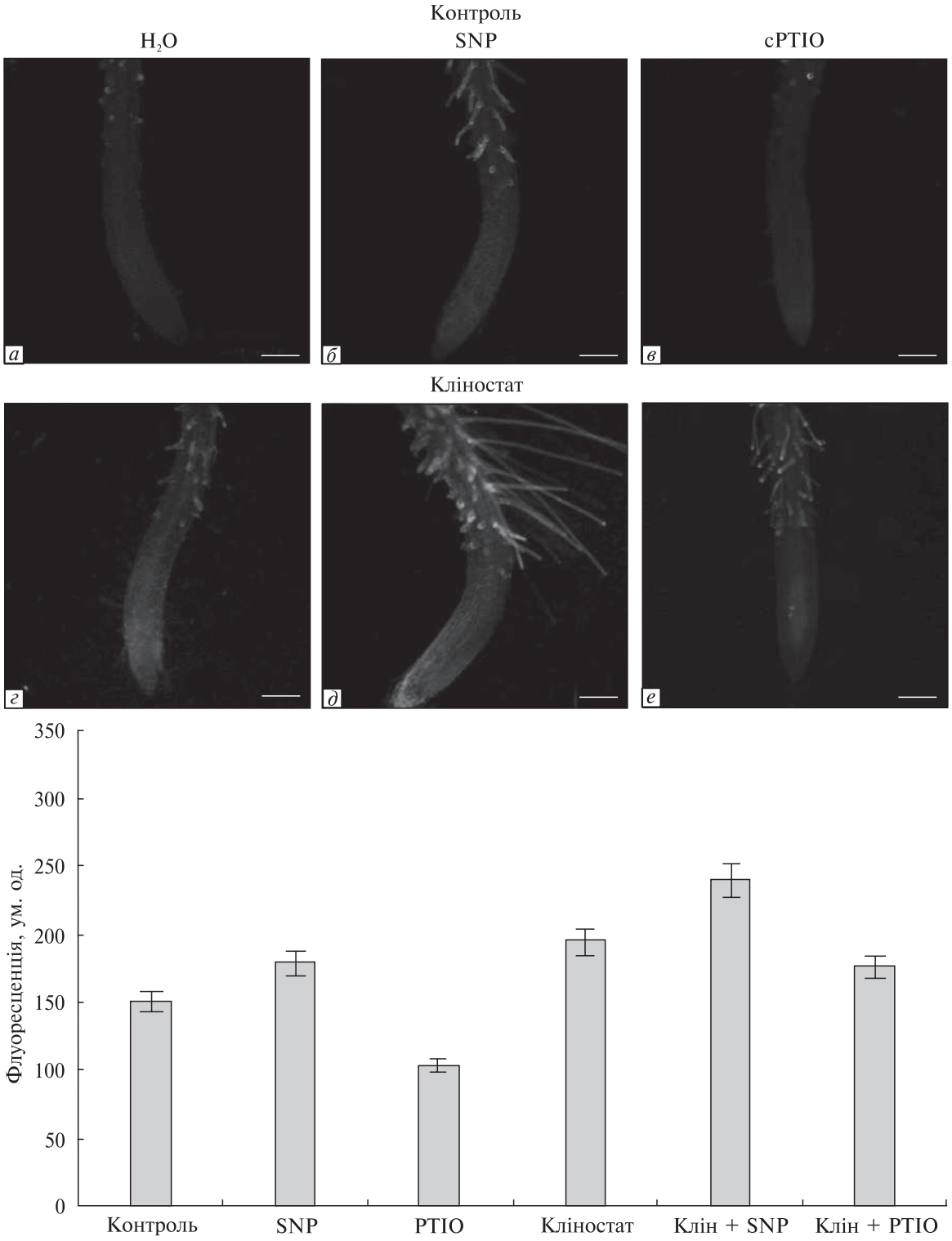

Рис. 4. Локалізація NO в клітинах кореня та кореневих волосках *A. thaliana* на 6-ту добу вирощування за нормальних умов і мікрогравітації, а також за обробки SNP чи cPTIO. Масштаб: 10×

зниження деградації та обороту GSNO, яка є основною формою зберігання, найшвидшого джерела та буферу NO внаслідок присутності сигналу тяжіння (Yun et al, 2016). Одночасно збільшується рівень транспортера вакуолярного нітрату (NO_3^-) хлоридного каналу A (CLC-A), який опосередковує швидке накопичення NO_3^- у вакуолях та вивільнення в цитозолі (de Angeli et al, 2007). Ці зміни вказують на прискорення синтезу NO та зниження буферизації його активності за відсутності сили тяжіння. Дія NO на білки призводить до S-нітрозилювання, що може відбуватися через GSNO, NO, або продукт реакції NO супероксид та пероксинітрит ($ONOO^-$) (Mur et al, 2013). Показано, що активність GSNOR необхідна для деяких реакцій S-нітрозилювання, тоді як інші посттрансляційні модифікації відбуваються незалежно від GSNOR.

Отже, нами встановлено, що обробка насіння *A. thaliana* донором NO SNP, стимулюючи зміни ростових параметрів коренів, призводить до підвищення стійкості рослин до кліностатування. Після обробки насіння SNP вміст ендогенного NO у контрольних рослин на 6-ту добу вирощування підвищувався у 1,5 рази, у кліностатованих у 1,8 рази. На 9–12 добу вміст ендогенного NO поступово знижувався, що може свідчити про адаптацію рослин до умов кліностатування. За допомогою специфічного флуоресцентного зонда DAF-FM DA виявлено підвищення рівня флуоресценції в епідермальних клітинах апексів коренів та кореневих волосках у кліностатованих рослин, що свідчить про накопичення ендогенного NO в цих тканинах кореня за умов стресу.

На 6 добу вирощування за умов кліностатування, порівняно з контрольними рослинами, виявлено збільшення накопичення аутофагосом в епідермальних клітинах перехідної зони кореня з наступним зменшенням цього показника на 9–12 добу. Обробка насіння скавенджером NO cPTIO незначно пригнічувала ріст проростків, і цей ефект посилювався за умов кліностатування, включаючи значне зростання накопичення аутофагосом в епідермальних клітинах.

Таким чином, можна зробити висновок, що регулювання вмісту ендогенного NO є важливою складовою внутрішньоклітинних механізмів сигналінгу, які залучаються до відповіді клітин рослин на симульовану мікрогравітацію. Отримані результати слугуватимуть підгрунтям для розробки підходів підвищення адаптації рослин під час їх икультивування в умовах космічного польоту.

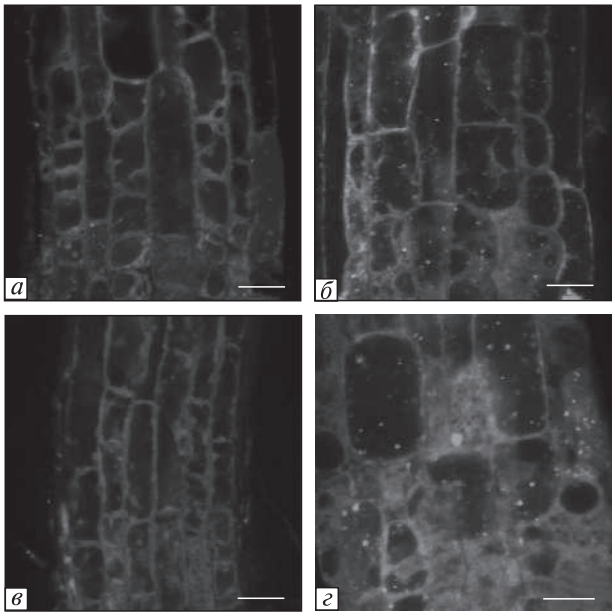

Рис. 5. Локалізація аутофагосом в клітинах кореня *A. thaliana* на 6 добу вирощування за умов кліностатування: *а* – контроль; *б* – кліностат; *в* – кліностат/SNP; *г* – кліностат/cPTIO. Масштаб: 20 мкм

Робота виконана за фінансової підтримки проекту «Розробка концепції регуляції розвитку та стресостійкості рослин для їх адаптації до умов космічних польотів шляхом залучення клітинно-біологічних ресурсів» цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень на 2018–2022 рр. (номер державної реєстрації 01118U003742).

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE *ARABIDOPSIS THALIANA* RESPONSE TO SIMULATED MICROGRAVITATION AND THE PARTICIPATION OF AUTOPHAGY IN THE MEDIATION OF THIS PROCESS

S.H. Plokhovska, R.Yu. Shadrina, O.A. Kravets, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine, Osypovskogo str., 2a, Kyiv 04123, Ukraine

E-mail: blume.yaroslav@nas.gov.ua

The role of nitric oxide (NO) in the response of plants to simulated microgravity has been studied. It was found that treatment of *Arabidopsis thaliana* seeds with NO donor sodium nitroprusside (SNP), stimulating changes in root growth parameters, and leads to increased plant resistance to clinostating. After treatment of SNP seeds, the content of endogenous NO in control plants on the 6th day of cultivation increased 1.5 times, and in clinostated - 1.8 times. The content of endogenous NO gradually decreased on 9-12 days which may indicate the adaptation of plants to the conditions of clinostating. Using a specific DAF-FM DA fluorescent probe, an increase in NO fluorescence was found in epidermal cells of root apexes and root hairs in clinostated plants, indicating the accumulation of endogenous NO in these root tissues under stress. On the 6 day of cultivation under clinostat condition compared with control plants an increase in the accumulation of autophagosomes in the epidermal cells of the transitional zone of the root with the following decrease in this indicator on 9-12 days. Seed treatment with cPTIO (NO scavenger) slightly inhibited seedling growth, and this effect was enhanced under clinostation, including a significant increase in the accumulation of autophagosomes in epidermal cells. Thus, the data obtained indicate that the regulation of endogenous NO content is an important component of intracellular signaling mechanisms that are involved in the response of plant cells to simulated microgravity.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Bassham DC, Laporte M, Marty F et al. (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2:2–11. https://doi.org/10.4161/auto.2092

Beckman J.S., Chen J., Ischiropoulos H., Crow J.P. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite Methods Enzymol 233:229–240. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33026-3

Blume YB, Krasylenko YA, Demchuk OM, Yemets AI. (2013) Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells Front Plant Sci 4:530. https://doi.org/doi.org/10.3389/fpls.2013.00530

Cao J-J, Liu C-X, Shao S-J, Zhou J. (2021) Molecular mechanisms of autophagy regulation in plants and their applications in agriculture Front Plant Sci 11:618944. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618944

Cao Y, Fan X, Shen Z et al. (2007) Nitric oxide affects preimplantation embryonic development in a rotating wall vessel bioreactor simulating microgravity. Cell Biol Int, 31:24–29. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.09.003

Cassia R, Amenta M, Fernández MB et al. (2019) The role of nitric oxide in the antioxidant defense of plants exposed to UV-B radiation. In: Hasanuzzaman M, Fotopoulos V, Nahar K, Fujita M (eds) Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants, 1st edn. Wiley, 555–572 p

Chen H, Dong J, Wang T. (2021) Autophagy in plant abiotic stress management Int J Mol Sci 22:4075. https://doi.org/10.3390/ijms22084075

Correa Aragunde MN, Foresi NP, Lamattina L. (2015) Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study J Exp Bot https://doi.org/10.1093/jxb/erv073

Correll MJ, Pyle TP, Millar KDL et al. (2013) Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes Planta **238**:519–533. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1909-x

de Angeli A, Thomine S, Frachisse J-M et al. (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes FEBS Lett 581:2367–2374. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.003

Fancy NN, Bahlmann A-K, Loake GJ. (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress Plant Cell Environ 40:462–472. https://doi.org/10.1111/pce.12707

Gilroy S, Białasek M, Suzuki N et al. (2016) ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants Plant Physiol 171:1606–1615. https://doi.org/10.1104/pp.16.00434

Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W. (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots Plant Physiol137:663–670.https://doi.org/10.1104/pp.104.054494

Khan M, Al Azawi TNI, Pande A et al. (2021) The role of nitric oxide-induced ATILL6 in growth and disease resistance in *Arabidopsis thaliana* Front Plant Sci 12:685156. doi: 10.3389/fpls.2021.685156

Klein-Nulend J, Bacabac RG, Veldhuijzen JP, Van Loon JJWA. (2003) Microgravity and bone cell mechanosensitivity Adv Space Res 32:1551–1559. https://doi.org/10.1016/S0273-1177(03)90395-4

Krasylenko YuA, Yemets AI, Sheremet YaA, Blume

YaB. (2012) Nitric oxide as a critical factor for *Arabidopsis* microtubules perceptions of UV-B irradiation Physiol Plant 145(4):505–15. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01530.x

Krasylenko YuA, Yemets AI, Blume YaB. (2017) Cell mechanisms of nitric oxide signaling in plants under abiotic stress conditions. In: Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress: A Functional Genomic Frontier (G. Pandey, Ed.), Wiley-Blackwell, 1:371–398. https://doi.org/10.1002/9781118889022.ch15

Kruse CPS, Wyatt SE. (2022) Nitric oxide, gravity response, and a unified schematic of plant signaling. Plant Sci 314:111105. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111105

Lin J, Wang L. (2021) Oxidative stress in oocytes and embryo development: implications for *in vitro* systems Antioxid Redox Signal 34:1394–1406. https://doi.org/10.1089/ars.2020.8209

Lytvyn DI, Raynaud C, Yemets AI et al. (2016) Involvement of inositol biosynthesis and nitric oxide in the mediation of UV-B induced oxidative stress Front Plant Sci 7:430. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00430

Lytvyn DI, Olenieva VD, Yemets AI, Blume YaB. (2018) Histochemical analysis of tissue-specific α-tubulin acetylation as a response to autophagy induction by different stress factors in *Arabidopsis thaliana* Cytol Genet 52:245–252. https://doi.org/10.3103/S0095452718040059

Mohd Amnan MA, Pua T-L, Lau S-E, et al. (2021) Osmotic stress in banana is relieved by exogenous nitric oxide Peer J 9:e10879. https://doi.org/10.7717/peerj.10879

Mugnai S, Pandolfi C, Masi E et al. (2014) Oxidative stress and NO signalling in the root apex as an early response to changes in gravity conditions BioMed Res Int 2014:1–10. https://doi.org/10.1155/2014/834134

Mur LAJ, Mandon J, Persijn S et al. (2013) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge AoB Plants 5:pls052. https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052

Nasir NNM, Ho C-L, Lamasudin DU, Saidi NB. (2020) Nitric oxide improves tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in banana Physiol Mol Plant Pathol 111:101503. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101503

Olenieva V, Lytvyn D, Yemets A et al. (2019) Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana* Cell Biol Int 43:1056–1064. https://doi.org/10.1002/cbin.10843

París R, Vazquez MM, Graziano M et al. (2018) Distribution of endogenous NO regulates early gravitropic response and PIN2 localization in *Arabidopsis* roots Front Plant Sci 9:495. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00495

Paul A-L, Zupanska AK, Schultz ER, Ferl RJ. (2013) Organ-specific remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome in response to spaceflight BMC Plant Biol 13:112. https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-112

Pedroso MC, Durzan DJ. (2000) Effect of different gravity environments on dna fragmentation and cell death in *Kalanchoл* leaves Ann Bot 86:983–994. https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1260

Plohovska SH, Krasylenko YA, Yemets AI. (2019) Nitric oxide modulates actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells at low temperatures Cell Biol Int 43:1020–1030. https://doi.org/10.1002/cbin.10931

Rizzo AM, Montorfano G, Negroni M et al. (2009) Simulated microgravity induce glutathione antioxidant pathwayin *Xenopus laevis* embryos Cell Biol Int 33:893–898. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.04.015

Sarath G, Bethke PC, Jones R, et al. (2006) Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses Planta 223:1154–1164. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0162-3

Siamwala JH, Reddy SH, Majumder S et al. (2010) Simulated microgravity perturbs actin polymerization to promote nitric oxide-associated migration in human immortalized Eahy926 cells Protoplasma 242:3–12. https://doi.org/10.1007/s00709-010-0114-z

Strohm A, Baldwin K, Masson P. (2012) Multiple roles for membrane-associated protein trafficking and signaling in gravitropism Front Plant Sci 3:274. https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00274

Sun H, Feng F, Liu J, Zhao Q. (2018) Nitric oxide affects rice root growth by regulating auxin transport under nitrate supply Front Plant Sci 9:659. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00659

Wang Z, Ma R, Zhao M et al. (2020) NO and ABA Interaction regulates tuber dormancy and sprouting in potato Front Plant Sci 11:311. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00311

Xiao Y, Liu Y, Wang G. (2012) Involvement of nitric oxide in the mechanism of biochemical alterations induced by simulated microgravity in *Microcystis aeruginosa* Adv Space Res 49:850–858. https://doi.org/10.1016/j.asr.2011.11.003

Xiong J, Li Y, Nie J. (2003) Effects of simulated microgravity on nitric oxide level in cardiac myocytes and its mechanism Sci China C Life Sci 46:302–309. https://doi.org/10.1360/03yc9032

Yemets AI, Krasylenko YuA, Blume YaB. (2015) Nitric oxide and UV-B radiation. In: Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants (Eds. Khan M.N.,

Mobin M., Mohammad F., Corpas F.J.), Springer-Verlag, 141–154 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2_9

Yemets A, Shadrina R, Horyunova I et al. (2021) Development of autophagy in plant cells under microgravity: the role of microtubules and atg8 proteins in autophagosome formation. In: Space Research in Ukraine. 2018–2020 (Ed. O. Fedorov) Akademperiodyka, 79–84 p.

Yun B-W, Feechan A, Yin M et al. (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity Nature 478:264–268. https://doi.org/10.1038/nature10427

Yun B-W, Skelly MJ, Yin M et al. (2016) Nitric oxide and S-nitrosoglutathione function additively during plant immunity New Phytol 211:516–526. https://doi.org/10.1111/nph.13903

Zhan N, Wang C, Chen L et al. (2018) S-nitrosylation targets GSNO reductase for selective autophagy during hypoxia responses in plants Mol Cell 71:142–154.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.024

Zhang Y, Su J, Cheng D et al. (2018) Nitric oxide contributes to methane-induced osmotic stress tolerance in mung bean BMC Plant Biol 18:207. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1426-y

Shadrina RY, Horiunova II, Blume Ya.B, Yemets AI. (2020) Autophagosome formation and transcriptional activity of *atg8* genes in Arabidopsis root cells during the development of autophagy under microgravity conditions Dopov. Nac. akad. nauk Ukr. 9:77–85. https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.09.077

Shadrina RY, Yemets AI, Blume YaB. (2019) Autophagy development as an adaptive response to microgravity conditions in *Arabidopsis thaliana* Factors of experimental evolution of organisms 25: 327–332. https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1186

Надійшла в редакцію 10.01.22
Після доопрацювання 14.02.22
Прийнята до друку 18.05.22