

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.09.077>

УДК 57.017.735+581.1

Р.Ю. Шадріна, І.І. Горюнова,

Я.Б. Блом, А.І. Ємець

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

E-mail: yemets.alla@nas.gov.ua

Формування аутофагосом та транскрипційна активність генів *atg8* у клітинах кореня арабідопсису при розвитку аутофагії за умов мікрогравітації

Представлено членом-кореспондентом НАН України А.І. Ємець

*Проведено морфологічний та цитологічний аналіз проростків коренів *Arabidopsis thaliana* і досліджено процес індукції аутофагії в їх клітинах за умов мікрогравітації. Встановлено істотне порушення розвитку коренів проростків і збільшення кількості аутофагосом в епідермальних клітинах перехідної зони кореня на 6-ту добу вирощування за умов кліноштатування, а також поступове зменшення їх кількості на 9-ту і 12-ту добу порівняно з контрольними рослинами, що може свідчити про адаптацію до умов зміненої гравітації. Результати транскрипційного аналізу активності генів родини *atg8* (*atg8a*, *atg8b*, *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*, *atg8h* та *atg8i*), залучених до реалізації початкових етапів аутофагії (6–12 діб кліноштатування), свідчать про залежний від часу характер змін рівня експресії більшості цих генів. Зокрема, зареєстровано підвищення рівня експресії генів *atg8a*, *atg8c*, *atg8d* на 6-ту добу, поступове їх зниження на 9-ту добу і різке зниження після 12 діб кліноштатування порівняно з контролем. Також встановлено значне (порівняно з контролем) підвищення рівня експресії генів *atg8e*, *atg8f* та *atg8i* на 6-, 9- та 12-ту добу. Отримані результати дають підставу стверджувати, що досліджувані гени *atg8* є специфічними для реалізації початкових етапів аутофагії, індукованої мікрогравітацією.*

Ключові слова: аутофагія, аутофагосоми, кліноштатування, гени *atg8*, *Arabidopsis thaliana*, мікрогравітація.

Аутофагія є еволюційно консервативним клітинно-біологічним механізмом деградації та рециркуляції нутрієнтів і макромолекул, що забезпечує виживання клітин за несприятливих умов. Саме тому процеси аутофагії задіяні в підтримці гомеостазу клітин, формуванні зародка, проростанні насіння, утворенні провідних тканин ксилеми, старінні листків і захисті від патогенів [1]. Деградація пошкоджених органел та білкових агрегатів відбувається завдяки функціонуванню літичних структур клітини. Для цього реалізація механізмів аутофагії передбачає формування двомембранних молекул — аутофагосом, які достав-

Цитування: Шадріна Р.Ю., Горюнова І.І., Блом Я.Б., Ємець А.І. Формування аутофагосом та транскрипційна активність генів *atg8* у клітинах кореня арабідопсису при розвитку аутофагії за умов мікрогравітації. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 9. С. 77–85. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.09.077>

ляють компоненти, що потребують деградації, до літичних вакуолей для їх подальшої рециркуляції [2]. Формування аутофагосом є високодинамічним процесом, до якого залучено велику кількість білків, зокрема АТГ (autophagy related proteins). Більшість АТГ-білків є консервативними у рослин оскільки їх участь у формуванні аутофагосом є критично важливою [3]. Раніше було встановлено, що УФ-опромінювання, голодування, осмотичний та сольовий стреси характерним чином впливають на профілі експресії генів *atg8* у *Arabidopsis thaliana* [4, 5].

Оскільки мікрогравітація також є стресовим фактором, що зумовлює істотні клітинно-фізіологічні зміни у рослин, нами було проведено попереднє дослідження [6] щодо впливу кліностаування на можливий розвиток аутофагії в коренях *A. thaliana*. Отримані результати свідчать про наявність морфологічних ознак індукції цього процесу в період від 6-ї до 12-ї доби з початку кліностаування. Це і стало поштовхом для початку досліджень впливу мікрогравітації на особливості експресії генів білків, залучених до реалізації аутофагії, оскільки це допоможе зрозуміти, як адаптувати та краще вирощувати рослини в умовах космічного польоту в майбутньому.

Саме тому метою даного дослідження було з'ясування початкових етапів розвитку аутофагії, пов'язаних з формуванням аутофагосом, і аналіз транскрипційних профілів генів *atg8* в *A. thaliana* в умовах змодельованої мікрогравітації.

Матеріали та методи. Як об'єкт дослідження використовували проростки *A. thaliana* екотипу Columbia Col-0. Насіння *A. thaliana* стерилізували в 10 %-му розчині гіпохлориту натрію (NaOCl), що містив 0,5 % Tween-20, протягом 15 хв і відмивали п'ять разів стерильною дистильованою водою. Після цього насіння висаджували на живильне середовище Мурасіге—Скуга (МС), що містило 4,4 г/л макро- та мікросолей середовища, набір вітамінів (M0222, Duchefa, Нідерланди), 10 % сахарози, 8,6 г агару, рН 5,6–5,7. Насіння стратифікували за температури 4 °С протягом доби, після чого чашки Петрі розміщували в кліностаці з режимом обертання 2 об/хв для подальшого пророщування насіння та росту проростків впродовж 12 діб при 22 °С і тривалості світлового періоду 14 год на добу.

Тотальну РНК з рослинного матеріалу (6-, 9- та 12-добові проростки *A. thaliana*) ізолювали за допомогою innuSOLV RNA Reagent (Analytik Jena AG, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. Якість та цілісність виділеної РНК перевіряли електрофоретично в 1 %-му агарозному гелі з формамідом. Концентрацію РНК у зразках визначали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 260 нм. Далі концентрацію ізольованої РНК нормалізували до 100 нг/мкл. кДНК синтезували за допомогою зворотної транскриптази (Revertasa Máxima, Thermo Fisher Scientific, США), 5х суміш для ПЛР, що містила 5 мМ дНТФ, 2,5 мМ MgCl₂ (Укрентех, Україна), 1 мкл олігонуклеотидів (OligodT (18) Thermo Fisher Scientific, США), 500 нг тотальної РНК як матриці, згідно з рекомендаціями виробника, та води, вільної від РНКаз. ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора Biorad CFX96 (США).

Реакційна суміш для проведення ПЛР у реальному часі містила: 0,25 мкл ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США), 50 нг матриці кДНК і 10 мкл барвника SYBR Green (Sigma-Aldrich, Німеччина) у 10х буфері. Умови проведення реакції: початкова денатурація — 94 °С протягом 12 хв; 44 цикли ампліфікації (денатурація — 94 °С, 15 с; зв'язування праймера з матрицею — 10 с; синтез — 72 °С, 40 с) та фінальна елонгація — при 72 °С про-

тягом 10 хв. Температура зв'язування праймера з матрицею: для *atg8a*, *atg8b* – 57 °С; для *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*, *atg8h* – 58 °С; для *atg8i* – 59 °С.

Використані в дослідженні пари праймерів наведені в таблиці.

Як контроль для ПЛР оцінювали рівень експресії фактору елонгації α (*AtEF α*). Продукти ПЛР аналізували за методом $\Delta\Delta$ СТ [7]. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2019. Для кожного досліджуваного показника було визначено його середнє значення та стандартне відхилення від середнього значення в межах однієї вибірки.

Для дослідження особливостей прижиттєвої локалізації аутофагосом у клітинах проростки *A. thaliana* обробляли барвником LysoTracker™ Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific, США) у концентрації 1 мМ з подальшим 3-кратним відмиванням проростків у натрієво-фосфатному буфері (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, рН 7,4) [8]. Зображення отримували за умов такої конфігурації режиму сканування: канал TRIC, збудження аргонним лазером з довжиною хвилі 647 нм, об'єктив Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC лазерного сканувального конфокального мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина).

Особливості локалізації аутофагосом за нормальних умов і кліностагування досліджували в епідермальних клітинах кореневого апекса, клітинах апікальної меристеми, епідермальних клітинах кори перехідної зони та зони розтягу, у трихобластах, атрихобластах і корневих волосках зони диференціації. Кожен дослід проводили не менше, ніж у трьох повторях, під час кожного з експериментів аналізували не менше як 100 коренів.

Результати та обговорення. Раніше нами вже було охарактеризовано зміни в морфології та рості коренів проростків *A. thaliana*, індуковані кліностагуванням [6]. Зокрема, за цих умов спостерігається вкорочення довжини коренів експериментальних рослин та їх закручування через відсутність постійної сили тяжіння (рис. 1). За умов зміненої гравітації виявлено істотні відмінності у диференціації клітин, швидкості росту коренів і проростків. Враховуючи характер цих змін протягом певного періоду вирощування, було вирішено проаналізувати ключові параметри розвитку аутофагії, починаючи з 6-ї доби експерименту.

Оскільки мікрогравітація є стресовим чинником, що призводить до морфологічних і ростових порушень проростків, і, відповідно, за цих умов починається розвиток аутофагії

Послідовності праймерів до генів *atg8*

Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер
<i>atg8a</i>	GGGTTTGTCTTCTCCCCCGAT	AGCAGTTGGAGGCAATGTGT
<i>atg8b</i>	ACCSTAAATCCATCCTCTCTGTT	TGGCTTTTTTCAGCTCCAAGC
<i>atg8c</i>	ACAGGACAAATGGCAACAAAGG	GCACAAAAGCATTGGAAGGCA
<i>atg8d</i>	TCTTGTGTTCGCGTGGTTCGAG	ACACCATGAACGGAAGACCT
<i>atg8e</i>	CAGAGTTTTATCSTTATCCGTTCCA	AGCATTTAAAACGTGGCGGAT
<i>atg8f</i>	GTAGTCTACAGGCGTGGAAGG	AGGTGGCTTGCTTGCTTAGTA
<i>atg8g</i>	GTCAGCTTCAGGCAGGATCA	ACCGATTGGTTGTGCCTACAT
<i>atg8h</i>	TGCCAGACATGGAGAAGAACA	CGTGTGAATCATCATCACTTGGT
<i>atg8i</i>	CSTTTTGACTTCGCCGCTTG	ATCAACCAAAGTTTTTCTCACTGC

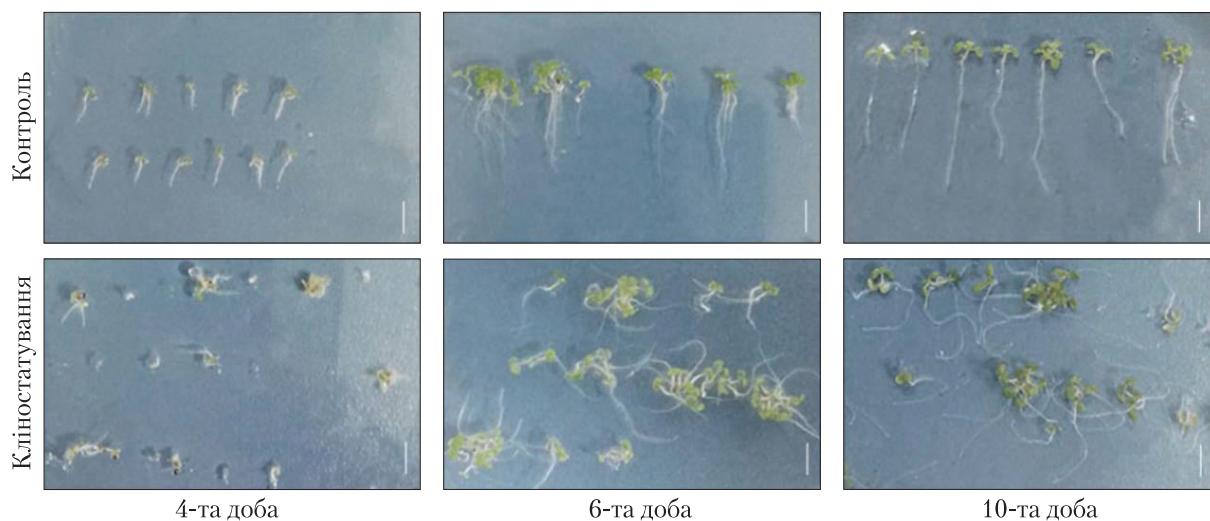


Рис. 1. Загальний вигляд проростків *A. thaliana*, вирощених за контрольних умов та за умов кліностагування. Масштабна лінійка – 0,5 см

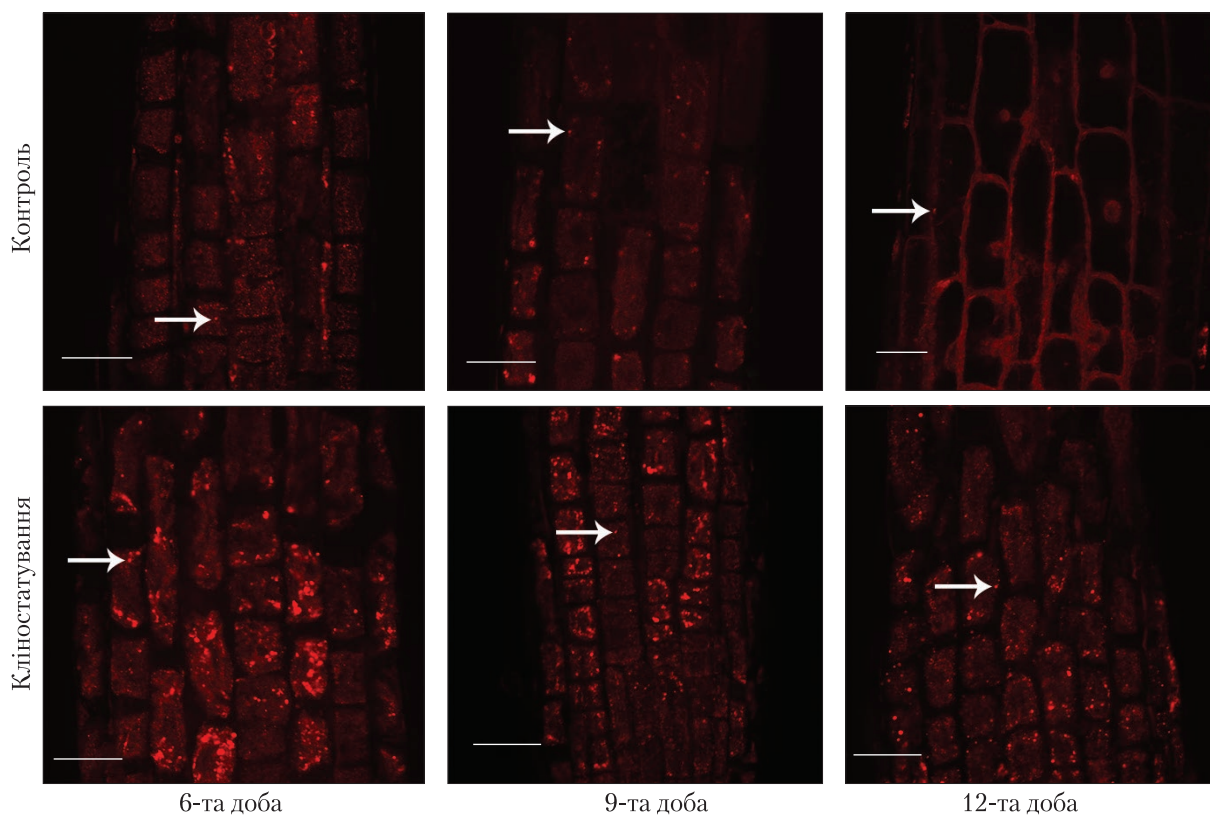


Рис. 2. Розподіл аутофлюоресом (вказані стрілками) в епідермальних клітинах перехідної зони коренів *A. thaliana* після 6, 9, 12 діб вирощування в контрольних умовах та за умов кліностагування. Масштабна лінійка – 20 мкм

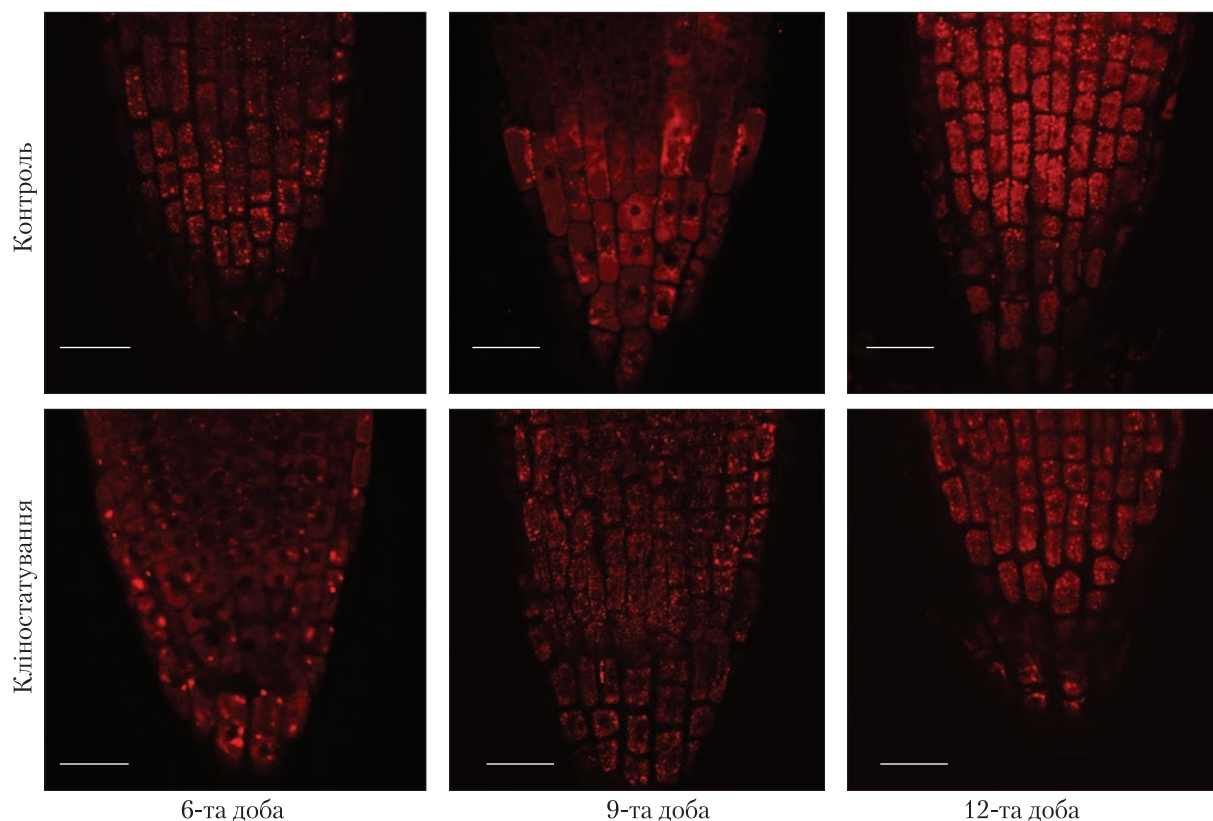


Рис. 3. Розподіл аутофагосом у клітинах кореневого чохла коренів *A. thaliana* після 6, 9, 12 діб вирощування в контрольних умовах та за умов кліностагування. Масштабна лінійка – 20 мкм

[6], нами було проаналізовано появу аутофагосом у клітинах досліджуваних рослин. Для виявлення аутофагосом у клітинах коренів *A. thaliana* використовували флуоресцентний барвник LysoTracker Red, оскільки він специфічно зв'язується з аутофагосомами і допомагає ідентифікувати ці внутрішньоклітинні структури в живих клітинах. Дослідження проводили на 6-, 9- та 12-ту добу росту проростків *A. thaliana* за умов кліностагування. Починаючи з 6-ї доби культивування (рис. 2) спостерігали появу забарвлених червоних структур розміром від 1 мкм, що відповідають аутофагосомам. Слід зазначити, що для епідермальних клітин перехідної зони кількість аутофагосом на 6-ту добу зростала порівняно з контролем. На 9-ту добу культивування (див. рис. 2) кількість аутофагосом зменшувалася порівняно з відповідним показником на 6-ту добу, але вона була більшою, ніж у контролі. На 12-ту добу (див. рис. 2) кліностагування кількість аутофагосом знижувалася порівняно з 9-ю добою, що може свідчити про адаптацію клітин коренів проростків до умов зміненої гравітації. Важливо зазначити, що розміри епідермальних клітин коренів експериментальних рослин були меншими порівняно з контрольними. Найімовірніше, це пов'язано зі стресовим навантаженням, що зазнають клітини внаслідок вирощування рослин в умовах кліностагування.

Також було проаналізовано розвиток аутофагії в клітинах кореневого чохла *A. thaliana*, який є зоною кореня, що складається з клітин, які під час росту кореня зазнають най-

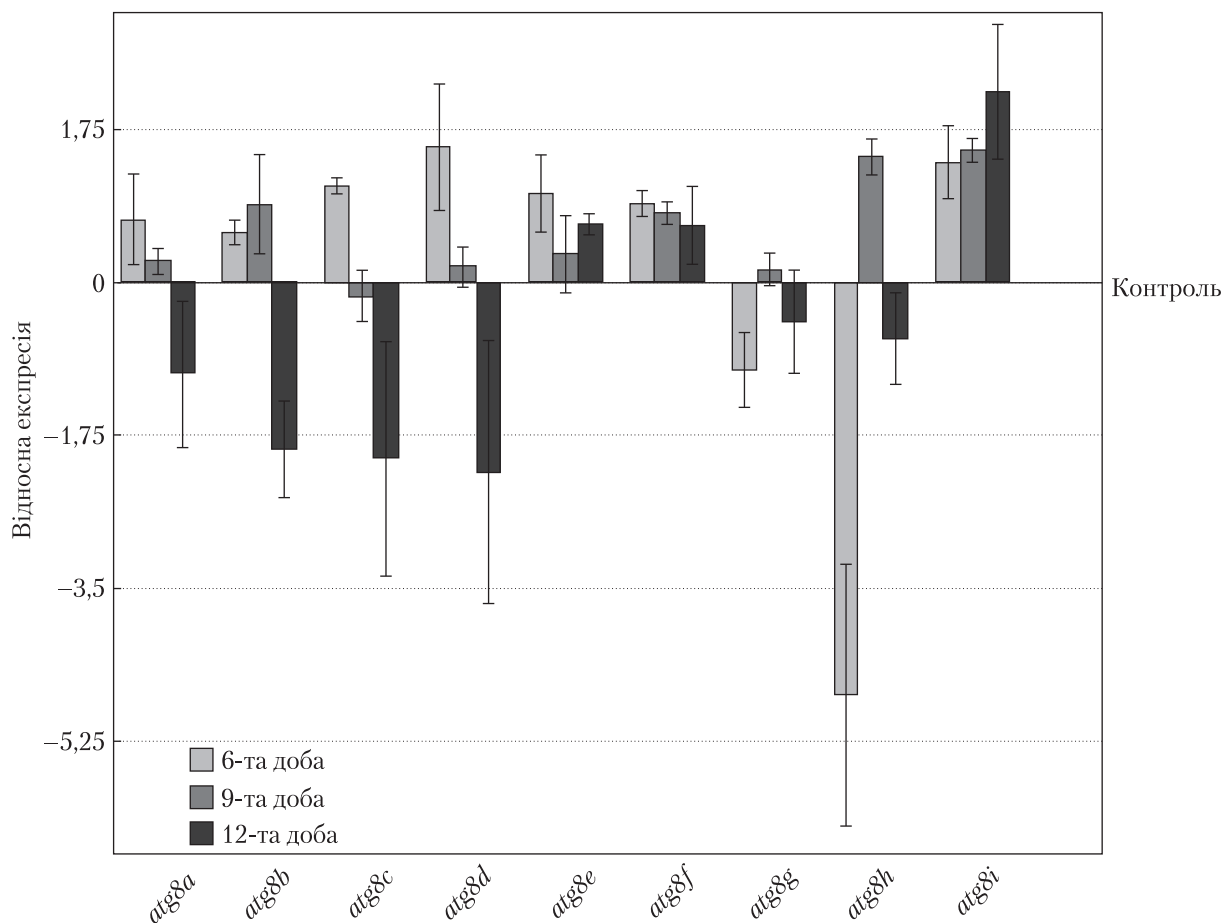


Рис. 4. Рівень експресії різних генів *atg8* у рослин *A. thaliana* через 6, 9, 12 днів вирощування за контрольних умов та за умов кліностагування

більше механічного стресу. Нами було встановлено, що в клітинах кореневого чохла як контрольних, так і рослин, які вирощували в умовах кліностагування, високий рівень розвитку аутофагії відзначається на 9-ту добу (рис. 3). Проте істотної різниці між рівнем розвитку аутофагії в клітинах контрольних та експериментальних рослин на 6-ту та 12-ту добу не спостерігали.

Відомо, що білок ATG8 відіграє важливу роль у процесах реалізації аутофагії. Локалізуючись як із зовнішньої, так і внутрішньої мембрани аутофагосоми, він відповідає за від'єднання та експансію преаутофагосомної структури [9]. У *A. thaliana* родина генів *atg8* представлена дев'ятьма генами, які віднесені до трьох субродин. Наявність багатьох генів *atg8* свідчить про те, що їх білкові продукти можуть бути задіяні на різних етапах формування аутофагосом [10]. У результаті молекулярно-генетичного аналізу профілів експресії усіх дев'яти генів *atg8* було виявлено, що рівень їх експресії залежить від тривалості кліностагування (рис. 4).

Зокрема, рівень експресії генів *atg8e*, *atg8f* та *atg8i* підвищувався на 6-, 9- і 12-ту добу кліностагування. Однак зміни рівня експресії гена *atg8i* в умовах кліностагування були

найбільш вираженими (у 1,5–1,8 раза вище, ніж у контролі) порівняно зі змінами цього показника для інших генів *atg8*. Порівнюючи отримані дані з результатами дослідження зміни рівня експресії різних генів *atg8* в умовах голодування, сольового та осмотичного стресів [11], ми також встановили підвищення рівня експресії (у 1,5–2 рази) генів *atg8e*, *atg8f* за умов впливу всіх досліджуваних стресових чинників (голодування, сольовий та осмотичний стрес) порівняно із контролем. При цьому для гена *atg8i* вищий рівень експресії порівняно з контролем відмічено тільки за умов голодування. Раніше було показано, що мутантні лінії *A. thaliana* з гіперекспресією генів *atg8e*, *atg8f* (35S-ATG8e, Actin-ATG8f) характеризуються посиленням розвитку аутофагії, що супроводжується зростанням кількості аутофагосом [12].

Для гена *atg8g* на жодному з часових проміжків не виявлено істотного підвищення рівня експресії порівняно з контролем, оскільки отримані показники були нижчими за контрольні: на 6-ту добу –1,0, на 9-ту добу – 0,15, на 12-ту добу –0,44. Це може свідчити про те, що, можливо, ген *atg8g* не залучений напряму до реалізації аутофагії, яка розвивається саме за умов мікрогравітації. Раніше нами також було встановлено, що рівень експресії гена *atg8g* в умовах осмотичного стресу був нижчим від контрольних значень.

У випадку генів *atg8a*, *atg8c*, *atg8d* спостерігали інші закономірності у змінах рівня їх експресії. На 6-ту добу кліностагування рівень експресії цих генів зростав і становив 0,72 для гена *atg8a*, 1,1 для гена *atg8c*, 1,55 для гена *atg8d*. У подальшому їх рівень експресії знижувався. На 9-ту добу експерименту значення рівня експресії становили 0,24 для гена *atg8a*, –0,15 для гена *atg8c*, 0,18 для гена *atg8d*. Ще нижчим рівень експресії цих генів був після 12 діб вирощування за умов кліностагування: –1,0 для гена *atg8a*, –2,0 для гена *atg8c* і –2,18 для гена *atg8d*.

Таким чином, нами вперше на транскрипційному рівні отримано результати, які підтверджують розвиток аутофагії, індукованої кліностагуванням у *A. thaliana*. Враховуючи ту обставину, що білок ATG8 є структурною одиницею аутофагосом і безпосередньо бере участь у розвитку стресоіндукованої аутофагії в клітині, результати проведеного нами транскриптомного аналізу різних генів цього білка свідчать як про розвиток аутофагії під впливом мікрогравітації, так і про те, що частина вищезазначених генів *atg8* може бути виокремлена як більш специфічна для повноцінної реалізації аутофагії за цих умов. Зокрема, встановлено підвищення рівня експресії генів *atg8e*, *atg8f* та *atg8i* на 6-, 9- і 12-ту добу вирощування рослин в умовах мікрогравітації. Отримані дані дають фундамент для подальшого вивчення клітинних механізмів залучення різних ізотипів білка ATG8 та їх взаємодії з іншими молекулярними компонентами, задіяними у розвитку аутофагії в умовах мікрогравітації.

Дослідження виконано за фінансової підтримки проєкту “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).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Chen Q., Shinozaki D., Luo J., Pottier M., Havé M., Marmagne A., Reisdorf-Cren M., Chardon F., Thomine S., Yoshimoto K., Masclaux-Daubresse C. Autophagy and nutrients management in plants. *Cells*. 2019. **8**, № 11. 1426. <https://doi.org/10.3390/cells8111426>
2. Masclaux-Daubresse C., Chen Q., Havé M. Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017. **39**. P. 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.001>
3. Tang J., Bassham D.C. Autophagy in crop plants: What's new beyond *Arabidopsis*? *Open Biology*. 2018. **8**, № 12. 180162. <https://doi.org/10.1098/rsob.180162>
4. Оленева В.Д., Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вплив УФ-В на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2018. № 1. С. 100–109. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.01.100>
5. Olenieva V., Lytvyn D., Yemets A., Bergounioux C., Blume Y. Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol. Int.* 2019. **43**, № 9. P. 1056–1064. <https://doi.org/10.1002/cbin.10843>
6. Шадріна Р.Ю., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на умови мікрогравітації. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. **25**. С. 327–332. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1186>
7. Rao X., Huang X., Zhou Z., Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat., Bioinforma. Biomath.* 2013. **3**, № 3. P. 71–85.
8. Chazotte B. Labeling lysosomes in live cells with LysoTracker. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011. **2**. pdb.prot5571. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5571>
9. Yang X., Bassham D.C. New insight into the mechanism and function of autophagy in plant cells. *Int.l Rev. Cell Mol. Biol.* 2015. **320**. P. 1–40. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.005>
10. Doelling J.H., Walker J.M., Friedman E.M., Thompson A.R., Vierstra R.D. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 2002. **277**, № 36. P. 33105–33114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204630200>
11. Оленева В. Д., Литвин Д. І., Ємець А. І., Блюм Я. Б. Вплив голодування, осмотичного та сольового стресів на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів* 2017. **15**, № 2. С. 174–180. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.876>
12. Chen Q., Soulay F., Saudemont B., Elmayan T., Marmagne A., & Masclaux-Daubresse, C. L. Overexpression of ATG8 in *Arabidopsis* stimulates autophagic activity and increases nitrogen remobilization efficiency and grain filling. *Plant Cell Physiol.* 2019. **60**, № 2. С. 343–352. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy214>

Надійшло до редакції 10.07.2020

REFERENCES

1. Chen, Q., Shinozaki, D., Luo, J., Pottier, M., Havé, M., Marmagne, A., Reisdorf-Cren, M., Chardon, F., Thomine, S., Yoshimoto, K. & Masclaux-Daubresse, C. (2019). Autophagy and nutrients management in plants. *Cells*, 8, No. 11. 1426. <https://doi.org/10.3390/cells8111426>
2. Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q. & Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy *Curr. Opin. Plant Biol.*, 39, pp. 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.001>
3. Tang, J. & Bassham, D. C. (2018). Autophagy in crop plants: What's new beyond *Arabidopsis*? *Open Biol.*, 8, No. 12. 180162. <https://doi.org/10.1098/rsob.180162>
4. Olenieva, V. D., Lytvyn, D. I., Yemets, A. I. & Blume, Ya. B. (2018). Influence of UV-B on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 1, pp. 100-109. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.01.100>
5. Olenieva, V., Lytvyn, D., Yemets, A., Bergounioux, C. & Blume, Y. (2019). Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol. Int.*, 43, No. 9, pp. 1056-1064. <https://doi.org/10.1002/cbin.10843>
6. Shadrina, R. Yu., Yemets, A. I. & Blume, Ya. B. (2019). Autophagy development as an adaptive response to microgravity conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Faktory eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 25, pp. 327-332. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1186>

- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. & Lin, X. (2013). An improvement of the 2^{-delta delta} CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.*, 3, No. 3, pp. 71-85.
- Chazotte, B. (2011). Labeling lysosomes in live cells with LysoTracker. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2, pdb.prot5571. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5571>
- Yang, X. & Bassham, D. C. (2015). New insight into the mechanism and function of autophagy in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 320, pp. 1-40. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.005>
- Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R. & Vierstra, R. D. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 277, No. 36, pp. 33105-33114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204630200>
- Olenieva, V. D., Lytvyn, D. I., Yemets, A. I. & Blume, Ya. B. (2017). Influence of sucrose starvation, osmotic and salt stresses on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules. *Visnik Ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv*, 15, No. 2, pp. 174-180. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.876>
- Chen, Q., Soulay, F., Saudemont, B., Elmayan, T., Marmagne, A. & Masclaux-Daubresse, C.L. (2019). Overexpression of ATG8 in *Arabidopsis* stimulates autophagic activity and increases nitrogen remobilization efficiency and grain filling. *Plant Cell Physiol.*, 60, No. 2, pp. 343-352. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy214>

Received 10.07.2020

R.Yu. Shadrina, I.I. Horiunova,

Ya.B. Blume, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: yemets.alla@nas.gov.ua

AUTOPHAGOSOME FORMATION AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF ATG8 GENES IN ARABIDOPSIS ROOT CELLS DURING THE DEVELOPMENT OF AUTOPHAGY UNDER MICROGRAVITY CONDITIONS

Morphological and cytological analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings roots growing under conditions mimicking a microgravity has been performed. Moreover, we assessed the process of autophagy induction in cells upon such conditions. Here, we report significant changes in the root development and the enhanced autophagosome formation in epidermal cells in the transitional zone on the 6th day of cultivation upon conditions on a rotating clinostat, as well as their gradual decrease on the 9th and 12th days, respectively, in comparison to control plants. These changes may suggest the induction of the adaptive process to the microgravity conditions. Family of *atg8* genes (*atg8a*, *atg8b*, *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*, *atg8h*, and *atg8i*) are involved in the implementation of initial stages of autophagy. Transcriptional analysis of *atg8* isoforms indicates clear time-dependent expression changes (6-12 days of microgravity) in the majority of such genes. In particular, the increased expression levels (*atg8a*, *atg8c*, *atg8d*) on the 6th day, a gradual decrease on the 9th day, and a significant decrease after 12 days of growing on a clinostat have been observed in comparison to control. Our results demonstrate the significantly elevated expression of *atg8e*, *atg8f*, and *atg8i* genes on the 6th, 9th, and 2th days. The obtained data suggest that studied *atg8* genes are specifically involved in autophagy induced by microgravity in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: autophagy, autophagosome, clinostatting, *atg8* genes, *Arabidopsis thaliana*, microgravity.