

Розробка концепції регуляції розвитку та стресостійкості рослин для їх адаптації до умов космічних польотів шляхом залучення клітинно-біологічних ресурсів	Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України	100,0
--	---	-------

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

за проектом Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень на 2018-2022 рр. «**Розробка концепції регуляції розвитку та стресостійкості рослин для їх адаптації до умов космічних польотів шляхом залучення клітинно-біологічних ресурсів**»

Етап 2 «Дослідження розвитку та особливостей аутофагії, зокрема, взаємодії генів тубуліну та білків *atg*, що опосередковують розвиток та реалізацію адаптивного процесу до умов кліноостатування»

ОРГАНІЗАЦІЯ-ВИКОНАВЕЦЬ:

Державна Установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»
Керівник – академік НАН України Я.Б. Блюм

В умовах мікрогравітації, коли рослини звільняються від обмеження сили тяжіння, змінюється профіль експресії генів, що кодують білки, відповідальні за метаболізм клітинної стінки, гормональний статус, системну полярність, організацію цитоскелету, оксидативний стрес, ліпідний обмін, клітинний поділ, а також розвиток програмованої клітинної загибелі (ПКЗ). Невирішеними залишаються питання індукції та розвитку аутофагії як етапу, що забезпечує адаптацію організму до змінених умов навколишнього середовища, і передує розвитку ПКЗ за умов невагомості. Одночасно, процеси розвитку аутофагії можуть прискорювати процеси старіння та відмирання органів і всієї рослини, і тому, одночасно, розглядаються як адаптивні. Отже, метою другого етапу проекту було дослідити розвиток та особливості перебігу аутофагії, індукованою кліноостатуванням, на етапах залучення цитоскелету, зокрема, взаємодії генів тубуліну, та білків аутофагії з родини *atg*, що мають опосередкувати розвиток та реалізацію адаптаційного процесу до умов мікрогравітації.

Вплив мікрогравітації досліджували з використанням модельного об'єкту *Arabidopsis thaliana*. Зокрема, вивчали ріст та розвиток проростків *A. thaliana* на різних часових проміжках культивування (1-15 доба культивування) та аналізували розвиток аутофагії, індукованої умовами мікрогравітації у клітинах коренів проростків *A. thaliana*. Візуалізацію аутофагосом проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням таких флуоресцентних барвників, як загальноживаний маркер аутофагосом монодансилкадаверин (МДК) та пропідіум йодид (PI), який дозволяє оцінити виживання клітин проростків *A. thaliana*.

Появу морфологічних ознак розвитку аутофагії було виявлено починаючи з 6-ї доби культивування в умовах зміненої гравітації. Зокрема, спостерігали появу забарвлених МДК структур розміром від 3 до 20 мкм. Для клітин кореневого чохла була характерною поява аутофагосом вже з 7-ї доби кліноостатування, а на 9-у добу розвиток аутофагії сягав максимуму. Також було виявлено, що на 10-у добу культивування у клітинах кореневого чохла кількість аутофагосом стрімко знижувалась у порівнянні з 9-м днем, що може бути ознакою адаптації коренів до умов мікрогравітації. У ході проведених дослідів було встановлено, що різні зони кореня виявляють різну чутливість до впливу умов мікрогравітації, зокрема,

найбільш активний розвиток аутофагії в зоні коренового чохла спостерігали на 9-ту добу кліностакування, а в зоні розтягнення кореня - на 10-ту добу.

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реальному часі було досліджено рівні експресії генів тубуліну (*tuba*) та генів білків, залучених до розвитку аутофагії на стадії формування аутофагосом: *atg8a*, *atg8b*, *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*, *atg8h*, *atg8i*. Як контроль для ПЛР в режимі реального часу використовували рівень експресії фактору елонгації α (*AtEFA*). Досліджуючи показники транскрипційної активності генів різних ізотопів білку *atg8* в умовах кліностакування було встановлено, що частина генів зазнає суттєвого підвищення експресії. Це, зокрема, гени *atg8b*, *atg8f*, *atg8h*, *atg8i*. В той же час для інших генів характерним було пригнічення експресії, а, саме, для генів *atg8a*, *atg8c*, *atg8d*, *atg8g*. Зокрема, рівні експресії генів *atg8c* та *atg8e* були низькими на усіх часових проміжках дослідження, також змінювалась експресія генів альфа-тубуліну. Однак рівень експресії гена *atg8h* різко підвищувався на 12-й день кліностакування, що може свідчити про специфічну роль білка *atg8h* в реалізації аутофагії як адаптивної відповіді на довготривалий стрес, а саме на зміну гравітації.

Статті за проектом:

Шадріна Р.Ю., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* за умов мікрогравітації. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2019, Т. 25, с. 327- 332.

Тези:

Шадріна Р.Ю., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Дослідження морфологічних ознак аутофагії в коренях проростків *Arabidopsis thaliana* в умовах кліностакування. Мат-ли 6-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (м. Яремче, Івано-Франківська область, Україна, 18 - 21 червня 2019 р.).

Керівник проекту ,

акад. НАН України Я.Б.Блюм

Метою етапу було дослідження особливостей розвитку аутофагії у рослин за умов мікрогравітації на етапах залучення таких ключових компонентів цитоскелету, як тубулін, та білків аутофагії родини atg до початкових етапів утворення аутофагосом. З цією метою вивчали ріст проростків *Arabidopsis thaliana* через 1-15 діб культивування та аналізували розвиток аутофагії, індукованої індукованою кліностакуванням, у клітинах коренів цих проростків, що дозволило виявити морфологічні ознаки розвитку аутофагії уже на 6-ту добу експерименту. В клітинах коренового чохла аутофагосоми з'являлись вже на 7-му добу кліностакування, приводячи до максимального рівня розвитку аутофагії уже на 9-у добу, тоді як на 10-у добу культивування у клітинах коренового чохла кількість аутофагосом стрімко знижувалась у порівнянні з 9-м днем, що може свідчити про адаптацію рослин до умов мікрогравітації. Також встановлено, що різні зони кореня виявляють різну чутливість до впливу умов мікрогравітації, зокрема, найбільш активний розвиток аутофагії в зоні коренового чохла спостерігали на 9-ту добу кліностакування, а в зоні розтягнення кореня - на 10-ту добу.

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реальному часі було встановлено закономірності змін рівнів експресії генів тубуліну (*tua1*, *tua2*, *tua3*, *tua4*, *tua5* та *tua6*) та генів білку *atg8* (*atg8a*, *atg8b*, *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*, *atg8h* та *atg8i*), залучених до розвитку аутофагії на стадії

формування аутофагосом. В результаті дослідження транскрипційної активності генів різних ізотипів білку *atg8* в умовах клінонстатування було встановлено суттєве підвищення рівнів експресії генів *atg8b*, *atg8f*, *atg8h*, *atg8i*, тоді, коли за цих умов рівні експресії генів *atg8a*, *atg8c*, *atg8d*, *atg8g* знижувались. Зокрема, різке підвищення рівня експресії гена *atg8h* на 12-й день клінонстатування може свідчити про специфічну роль білка *atg8h* в реалізації аутофагії як адаптивної відповіді на довготривалий стрес, а саме на зміну умов гравітації.