

STRESZCZENIE

Rola poliamin w biosyntezie tlenku azotu w reakcji roślin na stres solny

Natalia Napieraj

Zasolenie jest jednym z czynników środowiskowych, który ogranicza wzrost, rozwój oraz przetrwanie roślin, prowadząc do obniżenia produkcji rolnej. Ze względu na ponoszone straty finansowe oraz potrzebę zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego na świecie poszukuje się sposobów radzenia sobie z problemem zasolenia, m.in. korzystając ze zdobyczy genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii. W tym kontekście jedną z interesujących molekuł jest tlenek azotu (NO) - gazowa cząsteczka sygnałowa, która uczestniczy w licznych procesach fizjologicznych, a także bierze udział w odpowiedzi roślin na stres biotyczny i abiotyczny. Badania pokazują, iż podczas stresu solnego dochodzi do zwiększenia stężenia NO w organach roślin, co często jest łączone z indukcją tolerancji na zasolenie.

Mimo szerokiej wiedzy na temat roli NO u roślin, wciąż nie do końca wyjaśniona jest produkcja tej cząsteczki sygnałowej. U roślin zidentyfikowano kilka możliwych ścieżek biosyntezy NO. Może ona odbywać się przy udziale reduktazy azotanowej (NR), związanej z plazmolemą reduktazy $\text{NO}_2^-:\text{NO}$ (NiNOR), innych molibdoenzymów (komponentu redukującego amidoksym, oksydazy siarczynowej, oksydazy aldehydowej oraz oksydoreduktazy ksantynowej), mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, a także na skutek nieenzymatycznych przemian NO_2^- do NO w pewnych szczególnych warunkach oraz aktywności podobnej do syntazy tlenku azotu (NOS). NO może być produkowany również przy udziale poliamin (PAs) – cząsteczek, które biorą udział w procesach wzrostowych i rozwojowych oraz w odpowiedzi roślin na stres. Jednakże szczegółowy mechanizm tej ścieżki produkcji NO nie został jeszcze wyjaśniony. Z tego względu celem niniejszej pracy doktorskiej było poznanie roli PAs w biosyntezie NO w reakcji roślin na stres solny.

W pracy zademonstrowano, iż ekspozycja siewek ogórków na stres solny (spowodowany przez 120 mM NaCl) przez 1, 2 oraz 24 godz. skutkowałą zwiększeniem poziomu NO w korzeniach roślin. Aplikacja inhibitora aktywności NR i innych molibdoenzymów oraz inhibitora aktywności zwierzęcej NOS do traktowanych NaCl roślin skutecznie przeciwdziałała wzrostowi poziomu NO, wskazując na rolę NR i innych molibdoenzymów oraz aktywności podobnej do NOS w produkcji tej cząsteczki sygnałowej

w korzeniach siewek ogórków narażonych na stres solny. Z tego względu przeanalizowano wybrane ścieżki biosyntezy NO – zbadano aktywność całkowitą NR oraz aktywność związanej z plazmolewą reduktazy azotanowej (PM-NR), ekspresję genu *CsARC* oraz aktywność podobną do NOS. Wskazano, iż za zwiększoną biosyntezę NO w pierwszej godzinie stresu solnego może odpowiadać NR i inne molibdoenzymy, natomiast podczas dłuższego, 24-godzinnego stresu solnego, NO jest produkowany najprawdopodobniej przy udziale innych molibdoenzymów.

Spośród trzech analizowanych PAs - putrescyny (Put), spermidyny (Spd), sperminy (Spm) - jedynie w korzeniach roślin traktowanych Put przez 2 oraz 24 godz. odnotowano znaczny wzrost poziomu NO, który był skutecznie hamowany przez inhibitor aktywności NR i innych molibdoenzymów oraz przez inhibitor aktywności zwierzęcej NOS. Ze względu na podobne działanie Put oraz NaCl na zmianę poziomu NO w korzeniach siewek ogórków zbadano wpływ tej PA na produkcję NO w korzeniach roślin traktowanych solą. Zademonstrowano, iż Put w sposób zależny od czasu trwania stresu solnego reguluje produkcję NO w korzeniach siewek ogórków. Podczas stresu solnego trwającego 1 godz. Put ograniczała indukowaną stresem solnym, zależną od NR produkcję NO w korzeniach roślin. Ponadto Put redukowała wywołane solą zmiany aktywności NR na poziomie potranslacyjnym i genetycznym - obniżała stan aktywacji NR, co wskazuje na zmiany poziomu fosforylacji NR, stymulowała ekspresję *CsNR1* i hamowała ekspresję *CsNR3*. Z kolei w warunkach stresu solnego trwającego 24 godz. Put wzmacniała indukowaną zasoleniem biosyntezę NO w korzeniach siewek ogórków. Ta PA ograniczała hamujący wpływ NaCl na aktywność całkowitą NR i aktywność PM-NR, najprawdopodobniej dwutorowo prowadząc do zwiększonej biosyntezy NO przy możliwym udziale NR w cytoplazmie, a także PM-NR i Ni-NOR w apoplaście korzeni ogórka. W warunkach stresu solnego Put regulowała aktywność NR na poziomie potranslacyjnym poprzez zwiększanie stanu aktywacji NR, co wskazuje na zmiany poziomu defosforylacji enzymu.

29. 03. 2023 r. Szepienaj'

ABSTRACT

The role of polyamines in the biosynthesis of nitric oxide in plant responses to salt stress

Natalia Napieraj

Salinity is one of the environmental factors that limits plant growth, development, and survival, leading to a limitation in agricultural production. Due to the financial losses incurred and the need to ensure food security in the world, ways of dealing with the problem of salinity are taken e.g. using the achievements of genetics, molecular biology, and biotechnology. In this context, one of the interesting molecules is nitric oxide (NO), a gaseous signaling molecule that takes part in numerous physiological processes as well as plant responses to biotic and abiotic stresses. Studies show that during salt stress, the level of NO in plant organs increases, which is often linked with the induction of salinity tolerance.

Despite extensive knowledge about the role of NO in plants, the production of this signaling molecule is not fully understood. Several possible pathways for NO biosynthesis have been identified in plants. It can take place with the participation of nitrate reductase (NR), membrane-bound NO_2^- :NO reductase (NiNOR), other molybdoenzymes (amidoxime reducing component, sulfite oxidase, aldehyde oxidase, and xanthine oxidoreductase), mitochondrial electron transport chain, also due to the non-enzymatic reduction of NO_2^- to NO in particular conditions and nitric oxide synthase-like (NOS-like) activity. NO can also be generated with the participation of polyamines (PAs), which are involved in growth and development processes as well as plant responses to stress. However, the detailed mechanism of this NO production pathway has not yet been elucidated. Therefore, the doctoral thesis aimed to investigate the role of PAs in NO biosynthesis in plant response to salt stress.

In the doctoral thesis, it has been demonstrated that the exposure of cucumber seedlings to salt stress (caused by 120 mM NaCl) for 1, 2 and 24 hours resulted in an increase in the NO level in plant roots. The application of an inhibitor of NR and other molybdoenzymes and an inhibitor of animal NOS activity to NaCl-treated plants effectively diminished the increase in NO level, indicating the role of NR and other molybdoenzymes and NOS-like activity in the production of this signaling molecule in the roots of cucumber seedlings exposed to salt stress. Therefore, some pathways of NO biosynthesis, such as total NR activity, plasma membrane nitrate reductase (PM-NR) activity, *CsARC* gene expression, and NOS-like activity, were examined. It was demonstrated that increased NO biosynthesis in the first hour of salt stress may be caused by NR and other molybdoenzymes, whereas

during longer, 24-hour salt stress, NO is possibly generated with the participation of other molybdoenzymes.

Among the three examined PAs - putrescine (Put), spermidine (Spd), spermine (Spm) - a significant stimulation of NO level was observed only in the roots of plants treated with Put for 2 and 24 hours. This stimulation of NO level was effectively reduced by the inhibitor of the activity of NR and other molybdoenzymes and by the inhibitor of animal NOS activity. Due to the similar effect of Put and NaCl on the change in the NO level in the roots of cucumber seedlings, the impact of this PA on NO biosynthesis in the roots of salt-treated plants was investigated. It has been presented that Put regulates the NO production in the roots of cucumber seedlings in a manner dependent on the duration of salt stress. Put reduced salt-stress-induced, NR-dependent NO production in plant roots treated with salt for 1 hour. In addition, Put reduced salt-induced changes in NR activity at the post-translational and genetic levels; it decreased the NR activation state, indicating changes in the NR phosphorylation level, stimulated *CsNR1* expression, and inhibited *CsNR3* expression. In turn, under 24 hours of salt stress conditions, Put enhanced salinity-induced NO biosynthesis in cucumber seedling roots. This PA reduced the inhibitory effect of NaCl on total NR activity and PM-NR activity and, possibly in two ways, led to boosted NO biosynthesis with possible participation of NR in the cytoplasm, as well as PM-NR and Ni-NOR in the apoplast of cucumber roots. Furthermore, Put regulated NR activity at the post-translational level by increasing the NR activation state, which indicates changes in the level of enzyme dephosphorylation.

29. 03. 2023 r. Wapieniej