

ФЕНОТИП "STAY-GREEN" У МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *GDH1GDH2*

Е.Ю. Гарник¹, Д.В. Вильянен², А.А. Власова², В.И. Бельков¹, В.И. Тарасенко¹,
Ю.М. Константинов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *elga74@yandex.ru*

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Аннотация. Индуцированное темнотой старение растений – это пожелтение и отмирание листьев при длительном выдерживании растений в темноте. Мы обнаружили, что двойной нокаут-мутант арабидопсиса *gdh1gdh2* сохраняет зеленую окраску листьев при выдерживании в темноте более 4 суток, тогда как растения дикого типа в этих условиях желтеют. Содержание хлорофиллов снижалось в течение 7 суток в темноте до 40-50% от исходного у растений *Col-0* и только до 70-80% у растений *gdh1gdh2*. Соотношение хлорофиллов *a/b* снижалось у растений *gdh1gdh2* вследствие более медленного распада хлорофилла *b*. Анализ экспрессии генов, отвечающих за катаболизм хлорофиллов, в зеленых, желтеющих и желтых листьях *Col-0* и в типичных (зеленых) листьях *gdh1gdh2* после 5-6 суток в темноте показал, что замедленный распад хлорофиллов у мутанта – следствие низкой экспрессии генов *NYC1*, *PAO*, *PPH*, *SGR1* и *SGR2*, отвечающих за деградацию хлорофиллов. Таким образом, у растений мутантной линии *gdh1gdh2* нарушена генетическая программа распада хлорофиллов при индуцированном старении.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, индуцированное старение, хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, экспрессия генов, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-903-907

NAD-зависимая глутаматдегидрогеназа (GDH, EC1.4.1.2) катализирует окислительное дезаминирование глутамата до 2-оксоглутарата, а также обратную реакцию. В растениях *Arabidopsis thaliana* были клонированы и охарактеризованы три гена, кодирующие GDH, два из которых – *GDH1* и *GDH2* – ответственны за большую часть активности GDH у арабидопсиса [Fontaine et al., 2013]. Существует жизнеспособный двойной нокаут-мутант по генам GDH *gdh1gdh2* [Miyashita and Good, 2008]. Нами обнаружено, что мутант *gdh1gdh2* при длительном (4 суток и более) выдерживании растений в темноте в большой степени сохраняет зеленый цвет листьев, в отличие от растений дикого типа *Col-0*, листья которых при этом желтеют (рис. 1). Это явление (пожелтение и отмирание листьев при длительном выдерживании в темноте) называется индуцированным старением [Lim et al., 2007]. Важно отметить, что у арабидопсиса старение начинается в каждом листе в свои сроки, так что на одном и том же растении одновременно могут присутствовать листья на разных стадиях старения: от самых молодых и полностью зеленых до полностью пожелтевших и отмирающих (рис. 1).

Фенотип растений, не желтеющих при естественном либо индуцированном старении, носит название *stay-green* [Kusaba et al., 2013]. Такой фенотип может возникать по разным причинам: при отключении генов, непосредственно обеспечивающих деградацию хлорофиллов или ее регуляцию, при нарушениях синтеза фитогормонов, а также у некоторых мутантов по белкам аутофагии [Sakuraba et al., 2014]. На сегодняшний день в литературе нет упоминаний ни о *stay-green* фенотипе у мутантов по генам глутаматдегидрогеназы, ни о каком-либо участии GDH в метаболизме хлорофиллов.



Рис. 1. Индуцированное старение листьев двух линий арабидопсиса. А - полные наборы листьев растений дикого типа (*Col-0*) и двойного мутанта по генам глутаматдегидрогеназы (*gdh1gdh2*) после 4 суток выдерживания растений в темноте. Б - состояние растений арабидопсиса *Col-0* и *gdh1gdh2* после 8 суток выдерживания в темноте.

Целью настоящей работы было изучение особенностей изменения содержания и состава хлорофиллов при длительном выдерживании в темноте растений мутантной линии *gdh1gdh2* в сравнении с линией дикого типа *Col-0*, а также изучение экспрессии ряда генов, ответственных за ключевые этапы деградации хлорофиллов, при развитии индуцированного старения в листьях *Col-0* и *gdh1gdh2*.

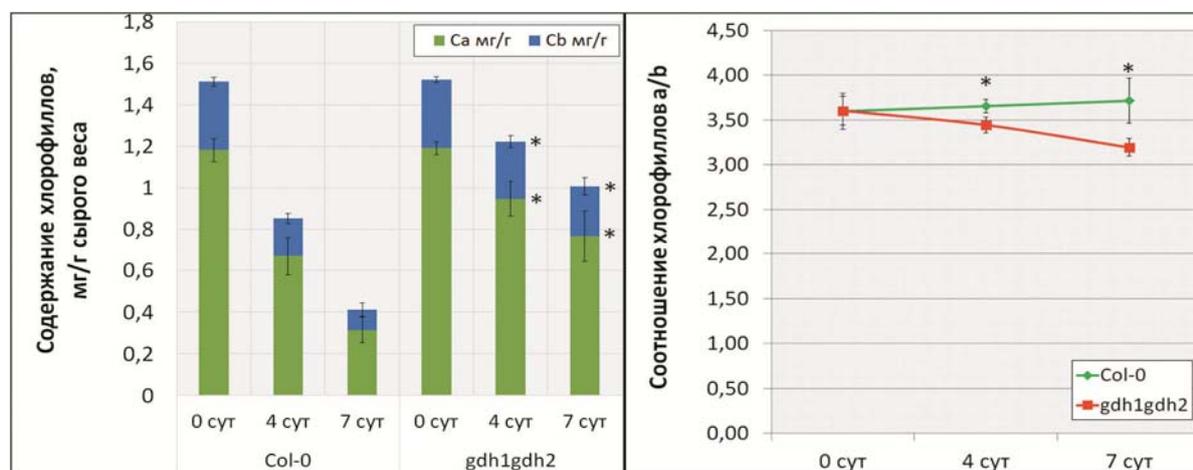


Рис. 2. Изменение содержания и состава хлорофиллов у растений *gdh1gdh2* и *Col-0* в течение 7 суток в темноте. $n \geq 5$. Бары обозначают стандартные отклонения. Знаком * обозначены различия между линиями *Col-0* и *gdh1gdh2* при $p < 0,01$.

Растения арабидопсиса линий *Col-0* и *gdh1gdh2* выращивали стерильно в чашках Петри в течение двадцати одного дня, затем убирали в темноту на 0, 4 и 7 суток. Хлорофиллы экстрагировали 80% ацетоном на холоде [Porra et al., 1989]. Содержание и состав хлорофиллов определяли спектрофотометрически, расчет концентраций хлорофиллов в экстрактах проводили согласно [Ni at al., 2009]:

$$C_a = 12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645} \text{ (Chlorophyll } a)$$

$$C_b = 22,9 * A_{645} - 4,86 * A_{663} \text{ (Chlorophyll } b)$$

$$C_{a+b} = 8,02 * A_{663} + 20,20 * A_{645} \text{ (Chlorophyll } a+b\text{)}$$

При выдерживании растений арабидопсиса в темноте более 4 суток происходило снижение содержания как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b* в растениях обеих линий (рис. 2). Снижение содержания хлорофиллов завершалось в течение 6-7 суток у обеих исследуемых линий, однако остаточное содержание хлорофиллов у *Col-0* составляло от 20% до 30%, у *gdh1gdh2* – от 50% до 60%. Таким образом, разрушение хлорофиллов у мутанта по генам GDH происходило менее эффективно. Кроме того, у растений *gdh1gdh2* проявилась тенденция к снижению соотношения хлорофиллов *a/b* в течение 7 суток в темноте, что говорит о более медленном разрушении хлорофилла *b* относительно хлорофилла *a*.

Распад хлорофиллов обеспечивается и регулируется экспрессией ряда генов, среди которых *NYC1* (хлорофилл *b*-редуктаза), *PPH* (феофитиназа), *PAO* (феофорбид *a* оксигеназа), гены *SGR1*, *SGR2*, *SGRL* (белки семейства SGR, обеспечивающие разборку хлорофилл-белковых комплексов и регулирующие распад хлорофиллов) [Tanaka et al., 2011]. Методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией мы исследовали изменения экспрессии перечисленных генов в процессе пожелтения листьев при индуцированном старении. Профили экспрессии оценивали после 6 суток выдерживания растений в темноте, отдельно для зеленых, желтеющих и полностью пожелтевших листьев растений линии *Col-0*, а также для типичных (зеленых) листьев из среднего яруса (т.е. не самых старых и не самых молодых) для растений *gdh1gdh2*.

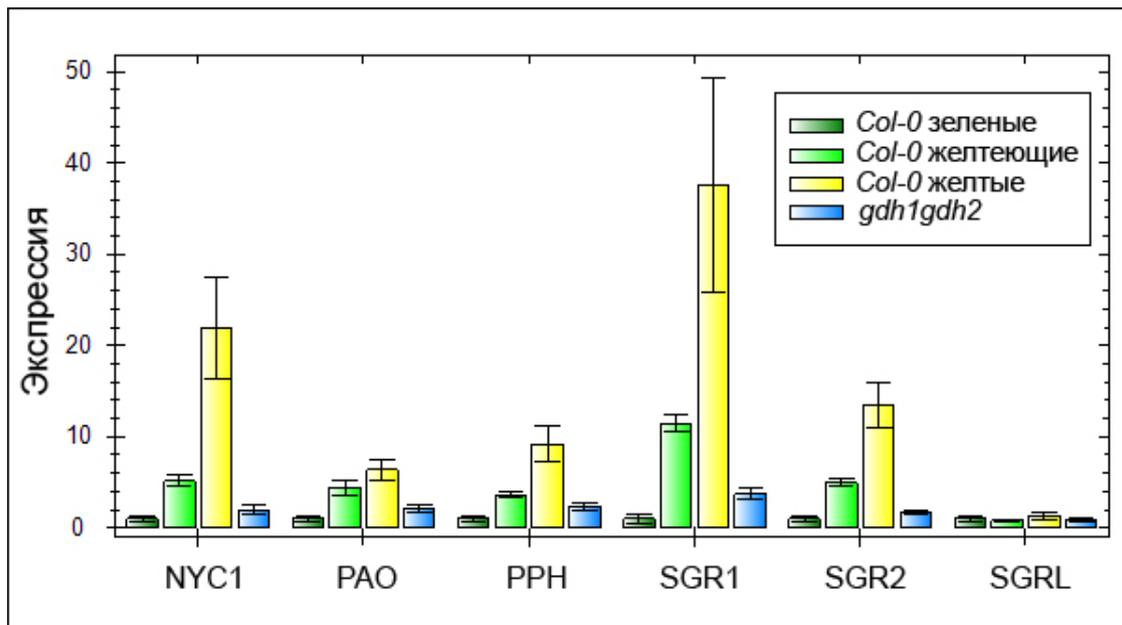


Рис. 3. Экспрессия генов катаболизма хлорофиллов в листьях линии *Col-0* на разных стадиях старения и в листьях мутантной линии *gdh1gdh2*. Растения были выдержаны в темноте в течение 6 суток. Показаны результаты ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Бары обозначают стандартные отклонения.

У растений дикого типа для всех исследованных генов, кроме *SGRL*, экспрессия была относительно низкой в зеленых листьях и значительно повышалась в желтеющих. В полностью пожелтевших листьях *Col-0* экспрессия генов, связанных с распадом хлорофиллов, может быть как очень высокой, так и низкой, в зависимости от того, началось ли отмирание тканей. Экспрессия тех же генов в листьях мутанта *gdh1gdh2* находится на низком уровне, сравнимом с уровнем в зеленом листе дикого типа (рис. 3). Это свидетельствует либо о нарушении программы деградации хлорофиллов в листьях мутантных растений (что хорошо согласуется с нашими данными о менее

эффективном распаде хлорофиллов у растений *gdh1gdh2*), либо о более раннем начале гибели их листьев. Ранее было показано, что при длительном выдерживании в темноте мутант *gdh1gdh2* начинает погибать раньше, чем растения дикого типа [Miyashita and Good, 2008].

Таким образом, индуцированное темнотой старение у мутанта арабидопсиса по генам NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы *gdh1gdh2* развивается иначе, чем у линии дикого типа *Col-0*. Снижение содержания хлорофиллов у мутанта происходит значительно медленнее. Ряд генов, ответственных за деградацию хлорофиллов, в листьях мутантных растений экспрессируется на более низком уровне, чем в желтеющих листьях растений *Col-0*, при одних и тех же сроках выдерживания в темноте. Обнаруженные факты позволяют предполагать наличие функциональной связи между активностью NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы и регуляцией процессов старения у растений.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Fontaine J.-X., Terce-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signalling and Behavior. – 2013. – V. 8, No. 3. – e23329.

Kusaba M., Tanaka A., Tanaka R. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence // Photosynth Res. – 2013. – V. 117. – P. 221–234.

Lim P. O., Kim J. H., Nam H. G. Leaf Senescence // Annu. Rev. Plant Biol. – 2007. – Vol. 58. – P. 115–136.

Miyashita Y., Good A. G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation // Journal of Experimental Botany. – 2008. – V. 59, No. 3. – P. 667–680.

Ni Z., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., Chen Z.J. Altered circadian rhythms regulate growth vigor in hybrids and allopolyploids // Nature. – 2009. – Vol. 457. – P. 327–331.

Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // Biochimica et Biophysica Acta. – 1989. – V. 975. – P. 384–394.

Sakuraba Y., Lee S-H., Kim Y-S., Park O.K., Hortensteiner S., Paek N.-C. Delayed degradation of chlorophylls and photosynthetic proteins in *Arabidopsis* autophagy mutants during stress-induced leaf yellowing // Journal of Experimental Botany. – 2014. – V. 65, No. 14. – P. 3915–3925.

Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T. Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana* // The Arabidopsis Book. – 2011. – e0145.

STAY-GREEN PHENOTYPE IN THE *ARABIDOPSIS THALIANA* GLUTAMATE DEHYDROGENASE MUTANT *GDH1GDH2*

E.Yu. Garnik¹, D.V. Vilyanen², A.A. Vlasova², V.I. Belkov¹, V.I. Tarasenko¹, Yu.M. Konstantinov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *elga74@yandex.ru*

²Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. Dark-induced senescence of plants is a process of leaf yellowing and dying-off in conditions of the long-term dark. We detected that the double knock-out Arabidopsis mutant *gdh1gdh2* retains a mainly green color of its leaves when incubated in the dark during four days and more, whereas wild type Arabidopsis plants turn yellow in the same conditions. Chlorophyll content decreased during 7 days in the dark to 40-50% of the initial level in the wild type Arabidopsis line *Col-0* but only to 70-80% of the initial level in the *gdh1gdh2* plants. Chlorophyll *a/b* rate decreased in the *gdh1gdh2* plants as a consequence of the slower chlorophyll *b* degradation. Gene expression analysis in green, yellowing and yellow *Col-0* leaves and in typical (green) *gdh1gdh2* leaves after 5-6 days in the dark demonstrated that the slow chlorophyll content fall in the mutant plants is a result of the low expression of genes *NYC1*, *PAO*, *PPH*, *SGR1* and *SGR2* responsible for chlorophyll degradation. So, the genetic program of chlorophyll destruction during a dark-induced senescence is disrupted in the *gdh1gdh2* mutant plants.

Keywords: *chlorophyll a*, *chlorophyll b*, *dark-induced senescence*, *gene expression*, *glutamate dehydrogenase*, *Arabidopsis thaliana*