

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ХЛОРОФИЛЛОВ У ДВОЙНОГО НОКАУТ-МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ГЕНАМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВЫДЕРЖИВАНИИ РАСТЕНИЙ В ТЕМНОТЕ

Д.В. Вильянен<sup>1</sup>, Е.Ю. Гарник<sup>2</sup>, В.И. Тарасенко<sup>2</sup>, Ю.М. Константинов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,

Иркутск, e-mail: akella\_lksm@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

Иркутск, e-mail: elga74@yandex.ru

Состав и содержание хлорофиллов у растений регулируется как стадией развития, так и внешними условиями (Lim et al., 2007). Известно, что воздействие внешних факторов (холода или тепла, засухи, отсутствия света) может запустить процесс индуцированного старения, который сопровождается, в первую очередь, снижением содержания хлорофиллов и изменением их состава, и визуально проявляется пожелтением листьев (Ougham et al., 2008). Однако в условиях длительного отсутствия света двойной нокаут-мутант *Arabidopsis thaliana* по генам NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы демонстрирует более медленное пожелтение, чем растения арабидопсиса дикого типа. Это указывает на возможную связь между функцией глутаматдегидрогеназы и регуляцией экспрессии генов, ответственных за синтез или распад хлорофиллов.

Прекурсором к синтезу всех тетрапирролов является 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), поэтому о синтезе хлорофиллов можно судить по экспрессии генов, регулирующих ее биосинтез. Первым из них является *GRS*, который кодирует глутамил-тРНК синтетазу. Следующий ген – *HEMA1* – кодирует глутамил-тРНК редуктазу и регулирует лимитирующую реакцию в биосинтезе АЛК. Ген *GSA1* кодирует глутамат-полуальдегид аминотрансферазу, которая катализирует завершающую реакцию в процессе биосинтеза АЛК (Tanaka et al., 2011).

Распад хлорофиллов, в свою очередь, также регулируется экспрессией ряда генов, среди которых *NYC1*, *PPH*, *PAO*, *SGR1*, *SGR2*, *SGRL* (рис. 1). *NYC1* кодирует хлорофилл *b*-редуктазу, *PAO* – феофорбид *a* оксигеназу, *PPH* – феофитиназу. Гены *SGR1*, *SGR2*, *SGRL* кодируют белки семейства *SGR*, обеспечивающие разборку хлорофилл-белковых комплексов и регулирующие распад хлорофиллов (Tanaka et al., 2011).

В данной работе мы использовали растения арабидопсиса двух линий – дикий тип *Col-0* и двойной нокаут-мутант *gdh1gdh2* – и отслеживали изменения в содержании и составе хлорофиллов при длительном выдерживании растений в темноте. Для этого арабидопсис выращивали в чашках Петри в течение двадцати одного дня, затем убрали в темноту на 0, 4 и 7 суток. Хлорофиллы экстрагировали 80 % ацетоном на холоду (Porra et al., 1989). Содержание и состав хлорофиллов определяли спектрофотометрически, расчет вели по формулам (Ni et al., 2009):

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

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

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

Мы обнаружили, что при выдерживании растений арабидопсиса в темноте более 4 суток происходит снижение содержания как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b*. Через 4 суток в темноте общее содержание хлорофилла у линии *Col-0* снижалось наполовину, через 7 суток снижение продолжалось. У растений *gdh1gdh2* снижение содержания хлорофиллов было выражено существенно слабее (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 55 до 60 % (рис. 2). Таким образом, разрушение хлорофиллов у мутанта происходило менее эффективно. У растений *gdh1gdh2* проявлялась тенденция к снижению соотношения хлорофиллов *a/b* в течение 4–7 суток в темноте вследствие относительно более медленного снижения содержания хлорофилла *b*.

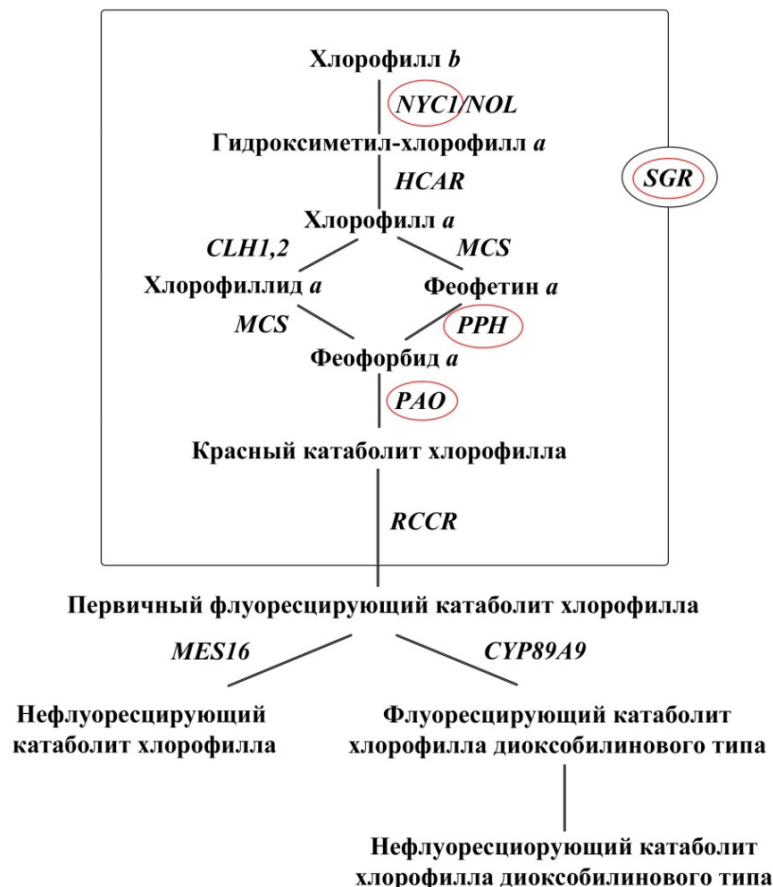


Рис. 1. Схема распада хлорофиллов (по: Oda-Yamamizo et al., 2016).

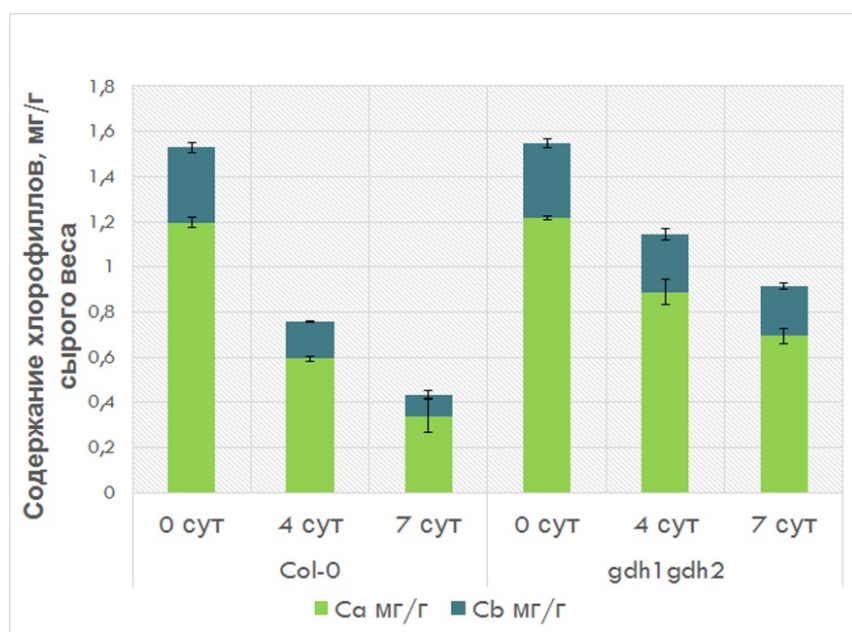


Рис. 2. Содержание и состав хлорофиллов в розетках арабидопсиса после 0, 4 и 7 суток в темноте.

В каждый момент времени содержание хлорофиллов в живой фотосинтезирующей ткани отражает баланс двух процессов: синтеза хлорофиллов и их распада. В целях изучения экспрессии генов, ответственных за синтез и распад хлорофиллов, мы исследовали экспрессию 6 генов, отвечающих за деградацию хлорофиллов (*NYC1*, *PPH*, *PAO*, *SGR1*, *SGR2*, *SGRL*), и 3 генов, регулирующих синтез АЛК (*GRS*, *HEMA1*, *GSA1*), методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Экспрессия всех исследованных генов изменялась в процессе индуцированного темнотой старения. При выдерживании растений *Col-0* и мутанта *gdh1gdh2* в течение 4 суток в темноте значительные различия в профиле экспрессии наблюдали для генов *PAO* и *SGR2*. После 7 суток пребывания в темноте экспрессия обоих генов оставалась практически неизменной по сравнению с точкой «4 суток» для обеих линий. Существенных различий в экспрессии генов, обеспечивающих синтез АЛК (*GRS*, *HEMA1* и *GSA1*), между линиями не обнаружено. Это может свидетельствовать о том, что более медленное снижение содержания хлорофиллов у мутанта обуславливается нарушением их распада, а не ускорением синтеза.

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 (*PAO*, *SGR2*), в мутантных растениях экспрессируются на более низком уровне, чем у растений *Col-0*, при одних и тех же сроках выдерживания в темноте. Обнаруженные факты хорошо согласуются с визуальными наблюдениями – менее выраженное пожелтение листьев у мутантных растений при длительном выдерживании их в темноте.

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

#### Литература

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

*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.

*Oda-Yamamizo C., Mitsuda N., Sakamoto S., Ogawa D.* The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves // *Scientific Reports.* – 2016. – Vol. 6. – e23609.

*Ougham H., Hörtensteiner S., Armstead I., Donnison I., King I., Thomas H., Mur L.* The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence // *Plant Biology.* – 2008. – Vol. 10. – P. 4–14.

*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. – Vol. 975. – P. 384–394.

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