

АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ

о результатах НИР по гранту за 2018 год

Конкурс 2018 года на соискание грантов
для поддержки научно-исследовательской работы
аспирантов и молодых сотрудников ИГУ.

Направление Биология, почвоведение и биотехнологии

Шифр гранта 091-18-220

1. Наименование НИР по гранту: «Изучение фенотипа Stay green у мутанта *Arabidopsis thaliana* по генам глутаматдегидрогеназы»
2. Структурное подразделение (кафедра, лаборатория): Химический факультет, кафедра теоретической и прикладной органической химии и полимеризационных процессов
3. Исполнитель НИР: Вильянен Дарья Валентиновна
4. Координаты исполнителя НИР 
5. Ожидаемые результаты в соответствии с заявленным планом работы

По итогам исследований ожидаются следующие результаты:

1. Будет определена динамика изменения жизнеспособности листьев растений линий *gdh1gdh2* и *Col-0* в условиях длительного выдерживания в темноте и будет установлено, есть ли разница между мутантом и диким типом по этому параметру. Это позволит установить либо исключить D-вариант фенотипа Stay green у растений линии *gdh1gdh2*.

2. Будет определена динамика снижения функциональности фотосинтетического аппарата растений линий *gdh1gdh2* и *Col-0* с помощью флуориметрии и будет осуществлено сравнение обеих линий по данному параметру. Это позволит определить степень функциональности фотосинтетического аппарата при старении и сделать выбор между А, В и С вариантами фенотипа Stay green у мутантных растений.

3. Будет исследован характер экспрессии генов-маркеров старения у растений обеих линий.

3. Будет исследован характер экспрессии генов-маркеров старения у растений обеих линий.

На основании этих данных будет сделан вывод о варианте фенотипа Stay green, развивающегося при нокаут-мутациях генов, кодирующих глутаматдегидрогеназу растений. В дальнейшем это позволит выяснить роль глутаматдегидрогеназы в регуляции программы старения растений.

6. Основные полученные научные результаты

6.1 Изучение проницаемости клеточных мембран как показателя жизнеспособности

Кондуктометрическое исследование проницаемости клеточных мембран позволяет оценить жизнеспособность клеток растений, что очень важно при изучении особенностей развития индуцированного старения.

В работе (Miyashita, 2008) растения *gdh1gdh2* погибали после шести суток в темноте, растения дикого типа – после 12 суток. В наших условиях мутантные растения жили несколько дольше, поэтому оценку жизнеспособности проводили после 0, 4 и 8 суток выдерживания в темноте.

На графике (рисунок 1) представлены результаты измерений. За максимальную принимается электрическая проводимость раствора инкубации листьев после нагревания в нем листьев арабидопсиса при 80°C в течение двадцати минут.

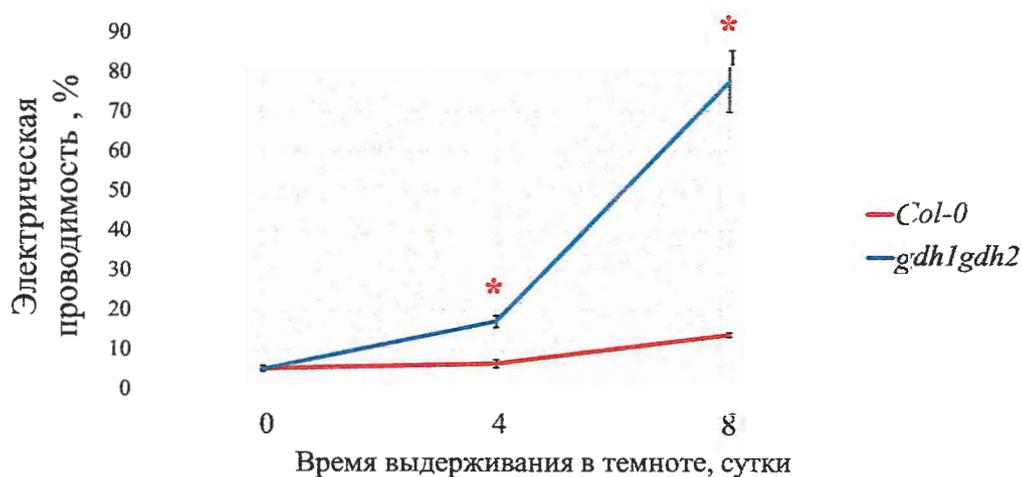


Рисунок 1 – Изменение электрической проводимости клеточных мембран растений арабидопсиса линий *Col-0* и *gdh1gdh2* при выдерживании в темноте в течение 0, 4

По графикам видно, что проницаемость мембран в нулевой день у обеих линий была на одинаковом уровне. После четырех суток в темноте начинают проявляться различия: рост проницаемости мембран у мутанта *gdh1gdh2* происходит значительно быстрее по сравнению с растениями дикого типа. После восьми суток в темноте электрическая проводимость раствора составляла $77,5 \pm 7,7\%$, в то время как у растений дикого типа – всего $13,8 \pm 0,6\%$. Более крутой рост кривой изменения мембранной проницаемости у мутанта *gdh1gdh2* и такие сильные различия в утечке электролитов между линиями показывают, что клеточные мембраны линии *gdh1gdh2* при длительном выдерживании в темноте разрушаются с более высокой скоростью, чем у растений дикого типа. Это может свидетельствовать о том, что *gdh1gdh2* при индуцированном темнотой старении погибает раньше растений дикого типа. Визуально это проявляется потерей растениями тургора и признаками отмирания нижних листьев.

По данным (Miyashita, 2008) у растений линии *gdh1gdh2*, выращенных на почве, после трех суток в темноте на кончиках листьев розеток наблюдали некроз, а после шести суток в темноте практически все мутантные растения погибали. Растения линий *gdh1* и *gdh2* (мутантные только по гену *GDH1* и *GDH2* соответственно) вели себя так же, как растения дикого типа: в условиях длительного выдерживания в темноте они погибали только через 12 суток. При выращивании растений в чашках Петри лишь 30% мутантных растений *gdh1gdh2* пережили выдерживание в темноте в течение четырех суток; после шести суток отсутствия света все мутантные растения погибали, в то время как растения дикого типа погибали лишь после 12 суток выдерживания в темноте.

В наших условиях как мутантные растения, так и растения дикого типа, жили в темноте несколько дольше. Это можно объяснить другим возрастом растений на момент начала экспериментов (в работе (Miyashita, 2008) 14 дней, у нас – 21 день), другим составом сред (у (Miyashita, 2008) 0,4% агар, у нас – 0,8% фитогель) и, возможно, какими-то условиями, не описанными в статье (Miyashita, 2008).

Полученные нами данные хорошо соотносятся с литературными данными: мутантные растения линии *gdh1gdh2* более чувствительны к длительному отсутствию света и в таких условиях гибнут быстрее растений дикого типа. При длительном выдерживании в темноте мутант арабидопсиса *gdh1gdh2* характеризуется меньшей жизнеспособностью по сравнению с растениями *Col-0*.

6.2 Оценка максимальной фотохимической эффективности фотосистемы II как одного из параметров эффективности фотосинтеза

Для определения максимальной фотохимической эффективности фотосистемы II растений используют расчетный параметр F_v/F_M , который представляет собой отношение $(F_M - F_0)/F_M$ и показывает долю световой энергии, пошедшей на фотохимические реакции. В исследованиях его используют в качестве индикатора фотохимической активности, а также для оценки степени деградации фотосинтетического аппарата (ФСА). В нормальных нестрессовых условиях для большинства растений значение этого показателя равно 0,83. При воздействии на растения стрессовых факторов показатель F_v/F_M снижается.

В процессе эксперимента растения выдерживали в темноте в течение 0, 2 и 4 суток. Такие сроки были обусловлены тем, что после 4 суток в темноте растения теряют тургор и становятся очень хрупкими, а следовательно, инструментально труднодоступными для исследования флуоресценции хлорофилла *a*.

Однако в процессе исследования было обнаружено, что после выдерживания растений в темноте в течение четырех суток вид кривой флуоресценции становится нетипичным (рисунок 2). Максимум в точке P исчезает, и максимумом на кривой флуоресценции становится точка J.

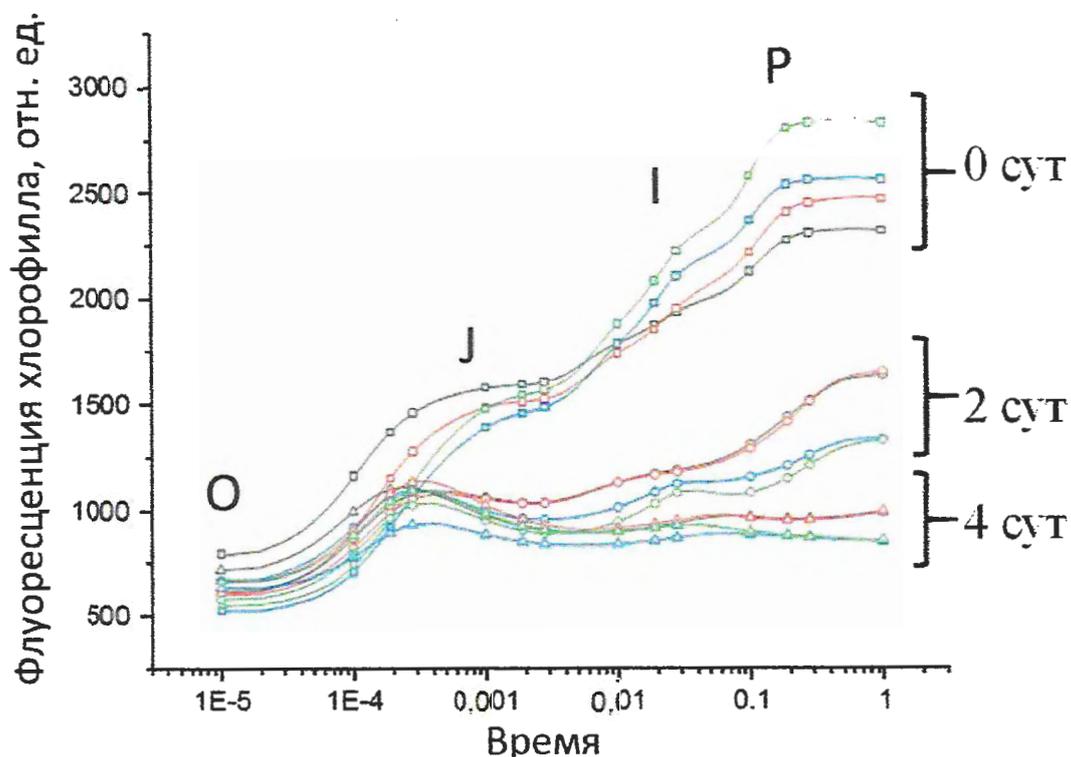


Рисунок 2 – Вид кривых флуоресценции растений арабидопсиса линий *Col-0* и *gdh1gdh2*: 0 сут - после 0 суток в темноте; 2 сут – после 2 суток в темноте; 4 сут – после 4 суток в темноте

Вследствие того, что алгоритм расчета параметров фотосинтеза предполагает, что максимум флуоресценции хлорофилла наблюдается в точке P, расчет после четырех суток в темноте становится некорректным, и данные интерпретировать в рамках классической модели флуоресценции хлорофилла невозможно. Из более чем 30 параметров, определяемых в ОЛР-тесте, адекватно рассчитывается только F_V/F_M , но вследствие отсутствия нормального максимума в точке P, его значение после выдерживания растений в темноте в течение четырех суток получается заниженным по отношению к реальному. Поэтому сравнивать F_V/F_M по абсолютной величине между первыми двумя и четырьмя сутками выдерживания в темноте некорректно. Однако тенденция к нарушению нормального хода кривой характерна и для дикого типа, и для мутанта *gdh1gdh2*, поэтому сравнивать F_V/F_M после четырех суток между линиями допустимо. Таким образом, наблюдая динамику снижения F_V/F_M у *Col-0* и *gdh1gdh2* в процессе индуцированного темнотой старения, мы не можем судить об абсолютной величине F_V/F_M , но можем оценить различие значений этого параметра между линиями.

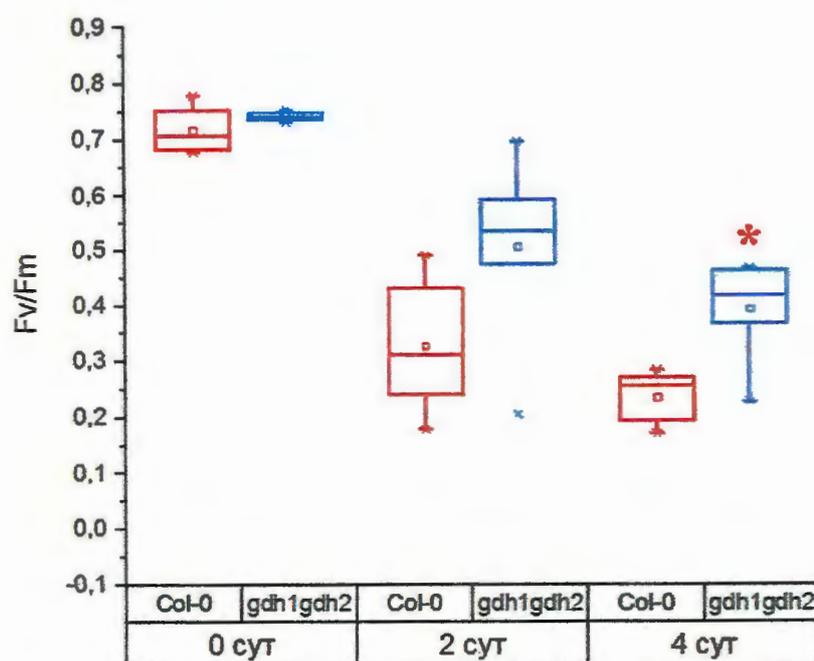


Рисунок 3 – Изменение F_v/F_m у линий арабидопсиса *gdh1gdh2* и *Col-0* при выдерживании в темноте в течение 0, 2 и 4 суток. Знак * показывает значимые различия между линиями по критерию Манна-Уитни при $P < 0,05$

Полученные нами результаты демонстрируют более медленное снижение F_v/F_m в течение индуцированного старения у мутанта *gdh1gdh2*, чем у растений дикого типа *Col-0* (рисунок 3). На фоне замедленного катаболизма хлорофиллов и подавленной экспрессии генов их деградации и более медленной деградации хлорофилла *b* относительно хлорофилла *a*, большая устойчивость ФСА мутантных растений к условиям длительной темноты по сравнению с растениями дикого типа свидетельствует о функциональном характере фенотипа Stay green.

6.3 Исследование экспрессии генов распада хлорофиллов, используемых в качестве генов-маркеров старения

На рисунке 4 приведена схема деградации хлорофиллов, красным выделены исследованные нами гены. Хлорофилл *b*-редуктаза кодируется геном *NYC1* (номер локуса At4g13250). Ген *PPH* (At5g13800) кодирует феофитиназу, катализирующую отделение от феофитина фитольного фрагмента с образованием феофорбида *a*. Феофорбид *a* оксигеназа, катализирующая превращение феофорбида *a* в красный катаболит, кодируется геном *PAO* (At3g44880). SGR – это группа регуляторных

белков. Экспрессия генов семейства *SGR* значительно изменяется в стареющих листьях арабидопсиса. К ним относятся гены *SGR1* (At4g22920), *SGR2* (At4g11910) и *SGRL* (At1g44000).

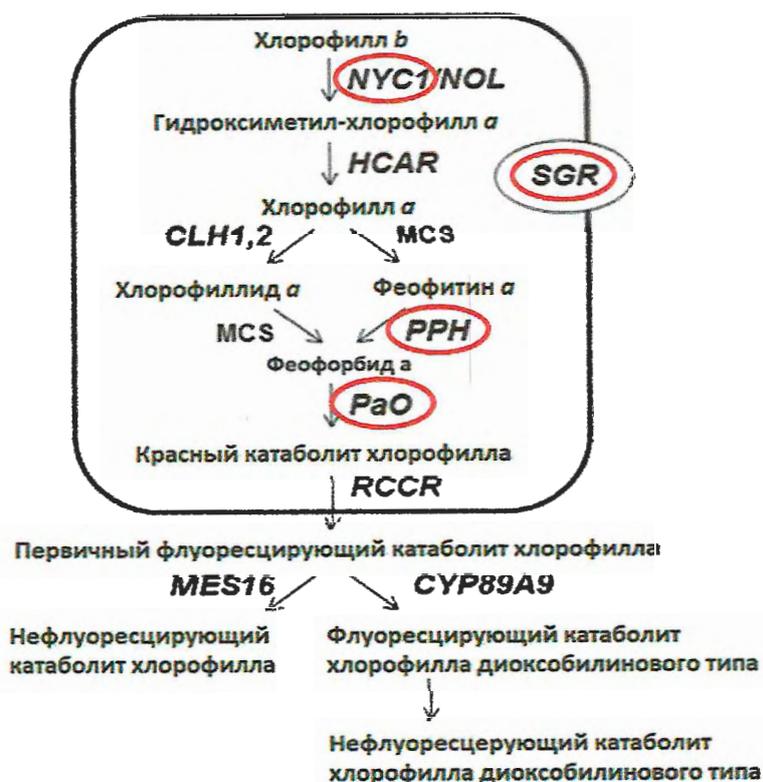


Рисунок 4 – Путь деградации хлорофиллов с указанием генов, контролирующих стадии их распада (по Oda-Yamamoto, 2016). Гены, выбранные для исследования, выделены красным

Основываясь на литературных данных, для исследования деградации хлорофиллов на уровне экспрессии мы выбрали гены *NYC1*, *PPH*, *PAO*, *SGR1* и *SGR2*, поскольку экспрессия этих генов значительно повышается при старении, а мутанты по этим генам демонстрируют фенотип Stay green.

Пробоподготовку проводили двумя способами: в первом случае отбирали целые розетки после выдерживания растений в темноте в течение 0, 4 и 7 суток. Экспрессию генов деградации хлорофиллов в целых розетках определяли для сопоставления этих данных с результатами по содержанию и составу хлорофиллов (содержание хлорофиллов определяли в розетках арабидопсиса).

Во втором случае отбирали только первую пару настоящих листьев с каждой розетки после выдерживания растений в темноте в течение 0, 2, 3, 4 и 5 суток. В

процессе развития проростка первыми разворачиваются семядольные листья, формирующиеся еще в зародыше. Они не считаются настоящими листьями. Далее формируется первая пара настоящих листьев. Развитие каждого листа растения в большей степени автономно, и разные листья в одной розетке имеют разный физиологический возраст. Процесс старения растений раньше всего начинается в первой паре настоящих листьев как в самых старших. Анатомическое соответствие отобранных у разных растений листьев позволило проследить развитие старения в конкретном органе.

Исследовали экспрессию генов деградации хлорофиллов в розетках арабидопсиса линий *gdh1gdh2* и *Col-0* после выдерживания растений в темноте в течение 0, 4 и 7 суток. Из рисунка 5 следует, что, по сравнению с растениями дикого типа, у мутантных растений снижена экспрессия генов *PAO*, *SGR1* и *SGR2*.

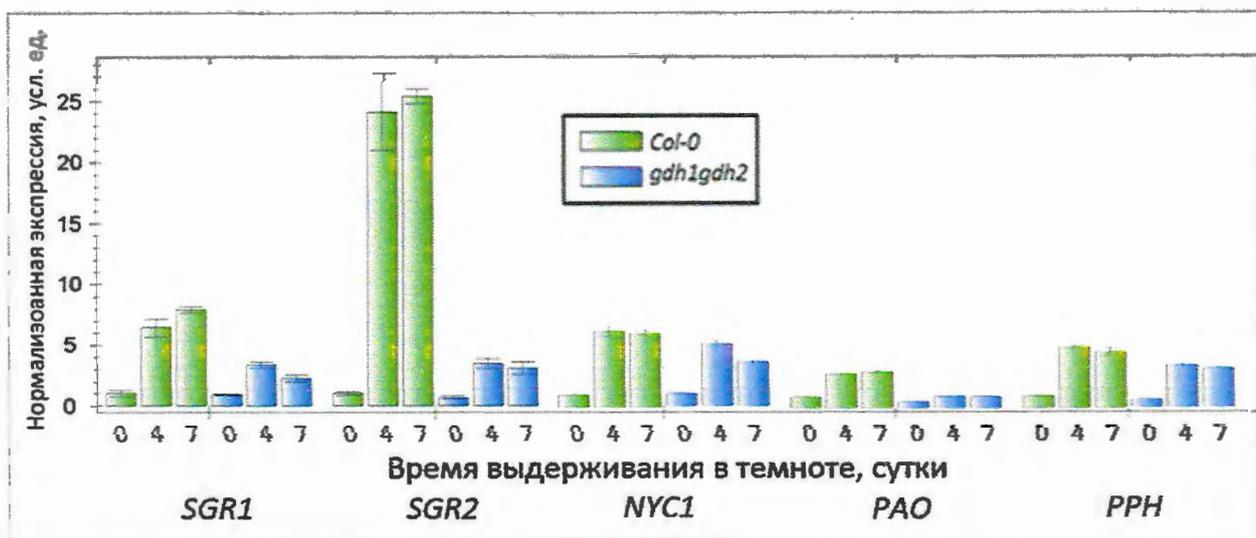


Рисунок 5 - Профили экспрессии генов деградации хлорофиллов в розетках арабидопсиса после выдерживания растений в темноте в течение 0, 4 и 7 суток

При исследовании экспрессии генов деградации хлорофиллов в первой паре настоящих листьев арабидопсиса после выдерживания растений в темноте в течение 0, 2, 3, 4 и 5 суток было обнаружено, что для дикого типа характерен подъем экспрессии всех генов в течение первых 2 суток в темноте и более плавное продолжение подъема до конца эксперимента (рисунок 6). По сравнению с растениями *Col-0*, у мутанта экспрессия всех исследуемых генов деградации хлорофиллов бы-

ла значительно ниже. Продолжающегося подъема экспрессии в течение эксперимента так же не наблюдали.

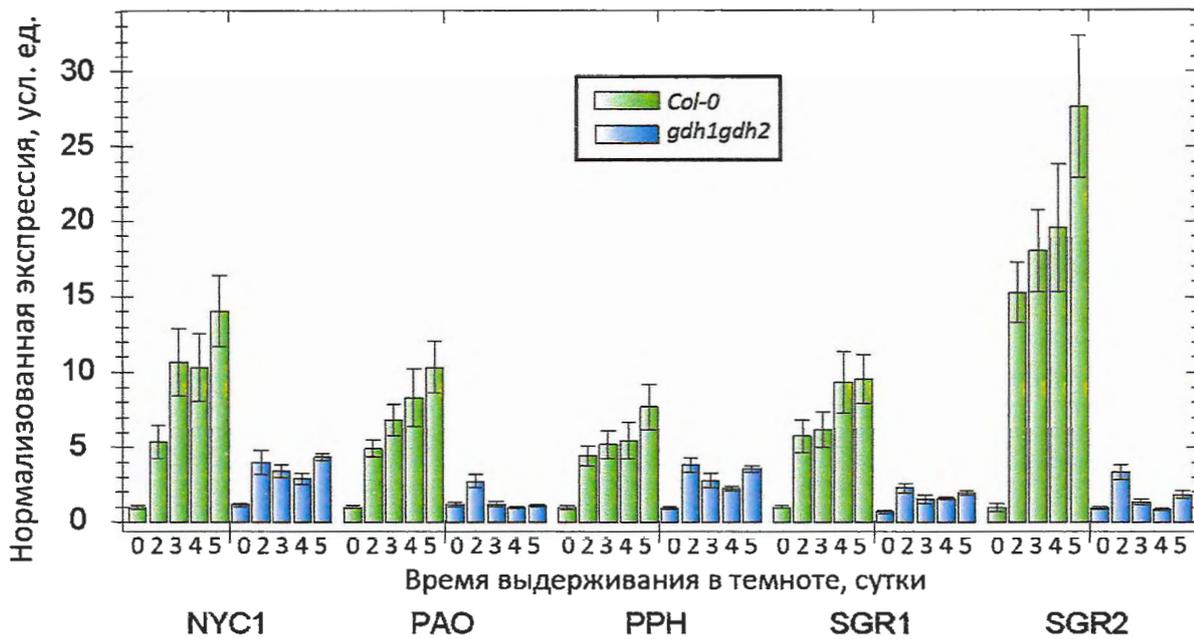


Рисунок 6 – Профили экспрессии генов деградации хлорофиллов в первой паре настоящих листьев арабидопсиса после выдерживания растений в темноте в течение 0, 2, 3, 4 и 5 суток

Мутации по генам деградации хлорофиллов приводят к появлению фенотипа Stay green С или D (Kusaba, 2013). Фенотип Stay green называют косметическим, если замедление деградации хлорофиллов не сопровождается снижением функциональности фотосинтетического аппарата, характерными перестройками метаболизма и другими признаками старения (типы С, D, E). Если одновременно с задержкой деградации хлорофиллов происходит задержка или замедление собственно старения, то такой Stay green называется функциональным (типы А и В) (Thomas, 2000). В работе (Schelbert, 2009) сообщалось, что при длительном выдерживании в темноте мутант арабидопсиса по гену феофетиназы *PPH* демонстрирует косметический (тип С) фенотип Stay green. Тот же фенотип проявляют растения арабидопсиса, мутантные по гену хлорофилл *b* редуктазы *NYC1*; растения арабидопсиса, мутантные по гену *SGR1*. Мутант по генам феофорбид *a* оксигеназы *PAO*, в отличие от предыдущих, демонстрирует комбинацию разновидностей С и D:

Таким образом, нарушения в экспрессии даже одного гена деградации хлорофиллов может привести к появлению фенотипа Stay green. Однако у растений *gdh1gdh2* ослаблена индукция экспрессии сразу нескольких генов, участвующих в разных стадиях деградации хлорофиллов. Это может говорить о действии общей причины, действующей до начала деградации хлорофиллов и приводящей к общему угнетению экспрессии соответствующих генов.

Выводы

1. Высокое остаточное содержание хлорофиллов у мутантных растений при длительном выдерживании в темноте (фенотип Stay green) связано с нарушением деградации хлорофиллов на уровне экспрессии генов.

2. При длительном выдерживании в темноте для растений *gdh1gdh2* характерна более медленная деградация фотосинтетического аппарата по сравнению с растениями *Col-0*. Это говорит о функциональном характере фенотипа «stay-green» у растений *gdh1gdh2*.

3. Жизнеспособность мутантных растений при длительном выдерживании в темноте снижается быстрее, чем у растений дикого типа.

4. При длительном выдерживании растений в темноте недостаток активности ГДГ приводит к перестройке метаболизма, которая обуславливает нарушение развития старения, и снижению жизнеспособности мутантных растений.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что фенотип Stay green, возникающий у растений арабидопсиса в результате нокаутирования двух генов, обеспечивающих активность глутаматдегидрогеназы, носит функциональный характер, то есть является не просто нарушением деградации хлорофиллов, а связан с нарушением развития старения (типы А или В).

Список литературы

1. Miyashita, Y. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation / Y. Miyashita, A. G. Good // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – Vol. 59, N. 3. – P. 667-680.
2. The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in *Arabidopsis* leaves / C. Oda-Yamamizo, N. Mitsuda, S. Sakamoto, D. Ogawa, M. Ohme-Takagi, A. Ohmiya // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 1-12.
3. Kusaba, M. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence / M. Kusaba, A. Tanaka, R. Tanaka // *Photosynth Res*. – 2013 – Vol. 117. – P. 221-234.
4. Thomas, H. Five ways to stay green / H. Thomas, C. J. Howarth // *Journal of Experimental Botany*. – 2000. – Vol. 51. – P. 329-337.
5. Pheophytin Pheophorbide Hydrolase (Pheophytinase) Is Involved in Chlorophyll Breakdown during Leaf Senescence in *Arabidopsis* / S. Schelbert, S. Aubry, B. Burla, B. Agne, F. Kessler, K. Krupinska, S. Hörtensteiner // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – P. 767-785.
6. Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves: Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction / A. Pruzinska, G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, T. Müller, K.-H. Ongania, B. Kräutler, J.-Y. Youn, S.J. Liljegren, S. Hörtensteiner // *Plant Physiol*. – 2005. – Vol. 139. – P. 52-63.

7. Предполагаемое использование результатов, в том числе в учебном процессе:
Разработанный экспериментальный подход может быть использован при изучении старения растений. Полученные результаты исследования могут быть включены в программы специализированных учебных курсов.

Исполнитель НИР по гранту Вильянен Дарья Валентиновна

(подпись)

