

Старение растений и глутаматдегидрогеназа: нарушение индуцированного темнотой старения у растений *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) мутантной линии *gdh1gdh2*

Гарник Е.Ю.^{1*}, Власова А.А.², Вильянен Д.В.³, Бельков В.И.¹, Тарасенко В.И.¹, Константинов Ю.М.^{1, 2}

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

³ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушчино, Россия

* elga74@yandex.ru

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*; старение растений; глутаматдегидрогеназа; индукция старения

Мотивация и цель: Модульный принцип строения тела высших растений [1, 2] обуславливает необходимость различать старение организма растения в целом и старение отдельных органов, поскольку каждый модуль/орган тела растения имеет собственный онтогенез и собственные сроки наступления разных стадий развития, включая старение. Старение листьев растений, по сути, сводится к организованному, генетически запрограммированному и строго регулируемому перераспределению ресурсов (в первую очередь – биологически доступного азота) от стареющего листа к репродуктивным, запасующим либо просто наиболее молодым органам [3]. Старение растений может быть индуцировано искусственно, причем факторы, индуцирующие начало массированного старения листьев или всего организма, часто видоспецифичны. Всё это делает растения интересной моделью для изучения генетически запрограммированных механизмов старения.

Нашей группой было обнаружено, что у растений двойного нокаут-мутанта *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) по генам глутаматдегидрогеназы, линия *gdh1gdh2*, при экспозиции в темноте более четырех суток (условия, индуцирующие старение у растений данного вида) не начинается пожелтение листьев, которое в норме является первым видимым признаком их старения. Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.2) – митохондриальный фермент, катализирующий превращение L-глутамат в 2-оксоглутарат, а также (в некоторых условиях) обратную реакцию. Таким образом, ГДГ обеспечивает связь между метаболизмом углерода и азота благодаря катаболизму 2-оксоглутарата в цикле трикарбоновых кислот. Экспрессия генов ГДГ у растений зависит от освещенности [4]. На свету экспрессия генов и ферментативная активность ГДГ минимальны у растений дикого типа и отсутствуют у растений мутантной линии *gdh1gdh2*. В условиях длительной экспозиции в темноте экспрессия генов и активность фермента ГДГ у растений дикого типа максимальны, у мутантных отсутствуют.

Целью настоящей работы было исследование нарушений нормального развития индуцированного темнотой старения у мутанта арабидопсиса по генам ГДГ и выяснение роли глутаматдегидрогеназы в регуляции развития старения растений.

Методы и алгоритмы: После экспозиции мутантных и контрольных растений в темноте оценивали содержание и состав хлорофиллов (спектрофотометрия), содержание растворимых белков (спектрофотометрия), ионную проницаемость клеточных мембран (кондуктометрия), а также экспрессию различных групп генов, ассоциированных со старением (транскрипционные факторы, иницирующие старение; гены, контролирующие деградацию хлорофиллов; гены, обеспечивающие ремобилизацию азота и перераспределение продуктов катаболизма). Исследование экспрессии проводили методом ПЦР после обратной транскрипции. Оценку указанных выше параметров проводили также на фоне обработки растений абсцизовой кислотой (главный гормональный регулятор старения у растений).

Результаты: Исходное содержание хлорофилла не различалось у растений дикого типа и мутантной линии *gdh1gdh2*, однако деградация хлорофилла в течение семи дней в темноте у мутантных растений происходит значительно медленнее. Соотношение хлорофиллов *a/b* в розетках растений *gdh1gdh2* снижалось в течение семи дней в темноте из-за более медленной деградации хлорофилла *b*. В розетках Col-0 не наблюдалось существенного изменения соотношения хлорофиллов *a/b*. Кондуктометрический тест на ионную проницаемость мембран отражает целостность клеточной мембраны и жизнеспособность растения в целом. Жизнеспособность растений снижалась в ходе темновой экспозиции для обоих генотипов, но гораздо быстрее для растений линии *gdh1gdh2*. Это признак фенотипа «stay-green» типа D – накопление токсичных метаболитов.

Для изучения динамики изменения экспрессии генов при нормальном течении темнового старения у растений дикого типа отбирали образцы листьев по окраске: желтые (самые нижние), желто-зеленые (средние) и зеленые (верхушечные). Пять генов деградации хлорофилла показали значительное увеличение уровней транскриптов от самых молодых (зеленых) до самых старых (полностью желтых) листьев. Для сравнения растений дикого типа и растений *gdh1gdh2* брали только нижнюю (самую старую) пару листьев из каждой розетки. Листья дикого типа демонстрировали постепенное повышение уровней транскриптов генов деградации хлорофилла на протяжении всего эксперимента. У мутантных растений экспрессия всех изученных генов деградации хлорофилла также имела тенденцию к повышению после двух дней пребывания в темноте, но дальнейшего увеличения экспрессии не наблюдалось.

Сбои в гормональной регуляции часто являются причиной нарушений старения растений, поэтому мы исследовали чувствительность растений к абсцизовой кислоте (АБК) как к основному и очень сильному индуктору старения. Чувствительность АБК у семян *gdh1gdh2* не была нарушена. Однако у взрослых растений мы наблюдали индукцию старения у растений дикого типа и гибель без признаков старения у растений *gdh1gdh2*. Мы исследовали экспрессию SAGs (генов, ассоциированных со старением) в верхних и нижних листьях растений после четырех дней экспозиции в темноте. В большинстве случаев индукции SAGs у мутантных растений не наблюдали. После обработки АБК наблюдали некоторый ответ генов *SAG113*, *SAG29*, *GLN1.1* у мутантных растений, но в целом экспрессия SAGs в растениях линии *gdh1gdh2* отличалась от паттернов экспрессии у растений дикого типа. Таким образом, развитие старения *gdh1gdh2* не полностью нечувствительно к АБК, однако его гормональная регуляция существенно нарушена.

Выводы: Обнаруженные факты позволяют предположить существование функциональной связи между экспрессией генов НАД(Н)-зависимой глутаматдегидрогеназы и регуляцией процессов старения у растений. Отсутствие активности глутаматдегидрогеназы при длительной темновой экспозиции, вероятно, является причиной нарушения старения растений *gdh1gdh2*, так как может приводить к переключению метаболических путей с последующим появлением токсичных метаболитов. Таким образом, глутаматдегидрогеназа может быть одним из важных регуляторов старения арабидопсиса.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и образования Российской Федерации, номер государственного задания FWSS-2022-0005.

Plant senescence and glutamate dehydrogenase: a disruption of dark-induced senescence in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) mutant line *gdh1gdh2*

Garnik E.Yu.^{1*}, Vlasova A.A.², Vilyanen D.V.³, Belkov V.A.¹, Tarasenko V.I.¹,
Konstantinov Yu.M.^{1,2}

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³ Institute of Basic Biological Problems, RAS, Federal Research Center, Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS, Pushchino, Russia

* elga74@yandex.ru

Key words: *Arabidopsis thaliana*; plant senescence; glutamate dehydrogenase; induced senescence

Motivation and Aim: The modular body structure of higher plants [1, 2] makes it necessary to distinguish between the aging of the plant organism as a whole and the senescence of individual organs, since each module/organ of the plant body has its own ontogenesis and its own timing of the onset of different stages of development, including senescence. Senescence of plant leaves, in essence, comes down to an organized, genetically programmed and strictly regulated redistribution of resources (primarily biologically available nitrogen) from the senescing leaf to reproductive, storage, or simply the youngest organs [3]. Plant senescence can be induced artificially, and the factors inducing the onset of massive senescence of leaves or the entire organism are often species-specific. All this makes plants an interesting model for studying genetically programmed mechanisms of senescence.

Our group found that in the double knockout mutant plants *gdh1gdh2* of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) carrying mutations in two glutamate dehydrogenase genes, when exposed to darkness for more than four days (conditions that induce senescence in *Arabidopsis*), leaves do not turn yellow, which is normally the first visible sign of their senescence. Glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) is a mitochondrial enzyme interconverting L-glutamate and 2-oxoglutarate (forward and back reactions), and thus providing a link between carbon and nitrogen metabolism because of catabolizing of 2-oxoglutarate in the TCA cycle. *GDH* genes expression is light dependent [4]. In the light GDH expression and enzyme activity is minimal in wild-type plants and absent in

gdh1gdh2. But in the prolonged dark GDH expression and enzyme activity in wild-type plants is maximal, and still missing in the *gdh1gdh2* line plants.

The aim of this work was to study disturbances in the normal development of dark-induced senescence in the *GDH* gene mutant of *Arabidopsis* and to elucidate the role of glutamate dehydrogenase in the regulation of the development of plant senescence.

Methods and Algorithms: After exposure of mutant and control plants to the dark, the content and composition of chlorophylls (spectrophotometry), the content of soluble proteins (spectrophotometry), ionic permeability of cell membranes (conductometry), as well as the expression of various groups of genes associated with senescence (transcription factors that initiate senescence; genes controlling chlorophyll degradation; genes providing nitrogen remobilization and redistribution of catabolic products) were assessed. Expression studies were carried out using PCR after reverse transcription. The above parameters were also assessed against the background of treating plants with abscisic acid (the main hormonal regulator of senescence in plants).

Results: The initial chlorophyll content does not differ in Col-0 and *gdh1gdh2* mutant. But the chlorophyll degradation during seven days in the dark is much slower in the mutant plants. Chlorophyll *b* degradation is slower in the mutant too. Chlorophyll *a/b* ratio in the *gdh1gdh2* plant rosettes decreased within seven days in the dark due to a slower degradation of chlorophyll *b*. In the Col-0 rosettes, no significant change in the chlorophyll *a/b* ratio was observed.

Ion leakage conductometry test demonstrate cell membrane integrity and plant viability at all. The higher ion leakage the lower membrane integrity and plant viability. Plant viability decreased during the dark exposition for both genotypes, but much more quickly for *gdh1gdh2*. It is a sign of the type D stay-green phenotype – toxic metabolite accumulation.

To study the dynamics of changes in the gene expression during the normal course of dark-induced senescence in wild-type plants, we sampled the leaves based on their color: yellow (the lowest true ones), yellow-green (middle), and green (apical). Five chlorophyll degradation genes showed a significant increase in transcript levels from the youngest (green) to the oldest (completely yellow) leaves. To compare wild-type and stay-green *gdh1gdh2* plants, we selected only the first (the oldest) pair of true leaves from each rosette. Col-0 leaves demonstrate a gradual increase in expression of the chlorophyll degradation genes throughout the experiment. In the mutant plants, expression of all the studied chlorophyll degradation genes also had a tendency to increase after two days in the dark, but no continued increase in expression was observed later.

Errors in hormonal regulation are the often reason for senescence disruptions, so we examined plant sensitivity to abscisic acid (ABA) as the main and very strong senescence inducer. ABA sensitivity was not broken in the seeds of *gdh1gdh2*. But in the adult plants, we can see senescence induction in Col-0 and death without senescence signs in *gdh1gdh2*. Abscisic acid induced senescence is disrupted too. We examined *SAGs* (Senescence Associated Genes) expression in the upper and the lower leaves of our plants after four days in the dark. In the most cases there was no *SAGs* induction in the mutant plants. ABA treatment creates a deeper stage of senescence than four days of the dark. Now we can see some answer of *SAG113*, *SAG29*, *GLN1.1* in the mutant plants, but as a whole *SAGs* expression in the *gdh1gdh2* is not the same as in wild-type plants. Thus, senescence program in *gdh1gdh2* is not totally insensitive to ABA, but disrupted significantly.

Conclusion: The discovered facts suggest the existence of a functional connection between expression of the NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes and regulation of senescence processes in plants. The lack of glutamate dehydrogenase activity during prolonged dark exposition is probably the reason of disrupted senescence in *gdh1gdh2* plants. It may lead to metabolic switches followed by some toxic metabolites appearance. Thus, glutamate dehydrogenase is one of essential senescence regulators in *Arabidopsis*.

Funding: The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project number FWSS-2022-0005.

Список литературы/References

1. Tomlinson P.B. Chance and design in the construction of plants. In: Axioms and Principles of Plant Construction. Dortrecht: Springer, 1982. doi 10.1007/978-94-009-7636-8_9
2. Antonova I.S., Lagunova N.G. On modular organization of some groups of plants. *Zhurnal Obshchei Biologii*. 1999;60(1):58-59
3. Gan S. Concepts and Types of Senescence in Plants. *Methods Mol Biol*. 2018;1744:3-8. doi 10.1007/978-1-4939-7672-0_1
4. Garnik E.Yu., Belkov V.I., Tarasenko V.I., Rudikovskii A.V., Konstantinov Yu.M. Expression of glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* depends on the redox state of plastoquinone pool. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2021;147:107-116. doi 10.1007/s11240-021-02111-5