

ВЗАИМОРЕГУЛЯЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ЦИТОКИНИНА И АУКСИНА В КОНТРОЛЕ ЕСТЕСТВЕННОГО СТАРЕНИЯ ЛИСТЬЕВ *Arabidopsis thaliana*

© 2020 г. М. Н. Данилова^{а, *}, А. С. Дорошенко^а, Н. В. Кудрякова^а,
А. В. Клепикова^{б, с}, В. Ю. Штратникова^д, В. В. Кузнецов^а

^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^бСколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

^сИнститут проблем передачи информации Российской академии наук, Москва, Россия

^дНаучно-исследовательский институт им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: mariadaniilova86@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.

После доработки 10.04.2020 г.

Принята к публикации 10.04.2020 г.

Естественное старение листьев — закономерный физиологический процесс, который подчиняется определенной генетической программе и контролируется различными фитогормонами. Цитокинины (ЦК) играют важнейшую роль в контроле старения листьев, являясь негативными регуляторами данного процесса. Ранее мы сообщали о пролонгированном вегетативном росте и развитии двойного нокаут-мутанта *Arabidopsis thaliana* по генам рецепторов ЦК *ahk2ahk3*. Согласно данным проведенного нами транскриптомного анализа и ОТ ПЦР РВ избранных генов, задержка старения листьев у мутанта *ahk2ahk3* сопровождалась повышением экспрессии группы генов семейства *SAUR* (small auxin-up RNA), кодирующих белки ответа на ауксина (от 4 до 281 раза), а также гена *SSPP* (senescence-suppressed protein phosphatase) с активацией экспрессии в 137 раз по сравнению с контрольным транскриптомом дикого типа. Таким образом, вполне возможно, что при значительном подавлении сигналинга ЦК регуляция старения листьев *Arabidopsis* осуществляется за счет компенсаторного механизма, связанного с изменением экспрессии генов семейства *SAUR*, а также определенного пула генов транспорта и сигналинга ауксинов.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, старение, мутанты, транскриптом, *транс*-факторы, цитокинины

DOI: 10.31857/S0015330320060032

ВВЕДЕНИЕ

Старение представляет собой разновидность возрастной программируемой клеточной смерти, которая происходит на клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях и приводит к отмиранию растения [1]. Несмотря на деструктивную направленность, старение — динамичный и генетически строго регулируемый физиологический процесс [2]. Его особой формой является старение листьев, в ходе которого происходит мобилизация и рециркуляция питательных веществ в развивающиеся семена или в другие части растений [2]. Важная роль в контроле старения листьев отводится фитогормонам, которые могут ингибировать этот процесс (цитокинины и частично ауксины) или выступают его позитивны-

ми регуляторами (салициловая, абсцизовая, жасмоновая кислоты и этилен).

Существование механизмов взаимной регуляции цитокининов (ЦК) и ауксинов не вызывает сомнений. Множественные связи между системами синтеза, рецепции и транспорта этих двух растительных гормонов предоставляют широкий спектр возможностей для их взаимного усиления или сдерживания [3]. Известно, например, что синергизм ЦК и ауксина в контроле деления клеток может трансформироваться в антагонизм при регуляции дифференцировки клеток и тканей [4], однако взаимодействие двух гормонов в контроле старения изучено недостаточно.

Система восприятия сигнала ауксина включает семейство транскрипционных репрессоров Aux/IAA, два транскрипционные фактора ARF и TIR1/AFB1-AFB5 F-box компоненты комплекса SCF. В присутствие ауксина белки Aux/IAA формиру-

Сокращения: ЦК — цитокинины, ОТ ПЦР РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени после обратной транскрипции, АНК — *Arabidopsis Histidine Kinase*

ют комплекс с TIR1/AFB1-AFB5, при этом IAA действует как молекулярный “клей”, удерживающий вместе компоненты этого ко-рецепторного комплекса. Формирование комплекса вызывает убиквитинирование белков репрессоров транскрипции Aux/IAA и их последующую деградацию 26S протеасомами с высвобождением ARF. Активированные ARF модулируют экспрессию многочисленных ауксин-зависимых генов. При этом большое число генов ко-рецепторов и транскрипционных факторов (IAA – 23, ARF – 23 и TIR – 5) обеспечивают широкое разнообразие возможных ответов на действие гормона [5].

Цитокинин реализует свое действие в растительной клетке и регулирует экспрессию ядерных генов по принципу транскрипционных каскадов при помощи двухкомпонентной сигнальной системы [6]. У растения *Arabidopsis thaliana* открыты три рецепторных сенсорных гистидинкиназы, кодируемые генами *CRE1/WOL/AHK4*, *AHK3* и *AHK2*, функции которых значительно перекрываются [7, 8]. Вместе с тем в контроле некоторых цитокинин-зависимых ответов выявлены АНК-специфичные реакции, которые, вероятно, говорят о способности индивидуальных рецепторов определять экспрессию набора генов, вовлеченных в конкретные цитокинин-зависимые процессы. У *A. thaliana* доминирующим рецептором цитокининов в листьях является АНК3, тогда как рецепторный белок АНК2 выполняет вспомогательную функцию [9, 10]. Цитокинин-опосредованный контроль продолжительности жизни листьев осуществляется рецептором АНК3 через фосфорилирование транскрипционного фактора ARR2 [11].

Ранее мы сообщали о пролонгированном онтогенезе двойного мутанта *A. thaliana ahk2ahk3*, листья которого характеризовались замедленным распадом хлорофилла и поддержанием повышенного уровня фотосинтетической функции [12]. На первый взгляд эти данные противоречат традиционным представлениям об омолаживающем действии цитокининов, тем более что одинарные мутанты *ahk3* с инактивированным геном *AHK3* отличались ускоренным старением. Для объяснения этого кажущегося противоречия и выявления молекулярных механизмов задержки естественного старения цитокининами нами был проведен сравнительный анализ транскриптомов, выделенных из стареющих листьев растений с инактивированными генами рецепторов ЦК.

Цель работы – выяснение возможных генных мишеней, изменение экспрессии которых лежит в основе пролонгированного онтогенеза мутантного растения *A. thaliana ahk2ahk3*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были растения *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), экотип Columbia-0, и

полученные на его основе двойные нокаут-мутанты *ahk2-2ahk3-3* (далее в тексте *ahk2ahk3*) и *ahk2cre1-12* (далее *ahk2ahk4*), а также одинарный мутант *ahk2-2* (далее *ahk2*), впервые описанные в работе Higuchi с соавт. [8]. Растения выращивали в почве при температуре 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль/(м² с). Для экспериментов использовали шестой лист 7-недельных растений. Экстракцию и определение суммарного хлорофилла проводили по методу Лихтеналлера [13].

Библиотеки мРНК для RNA-seq анализа получали на основе тотальной РНК, выделенной из листьев с помощью реагента Trizol (“Invitrogen”, США). Перед подготовкой библиотек качество РНК проверяли с помощью капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer2100 (“Agilent”, США). Для подготовки библиотек использовали РНК с показателем целостности RIN не менее 7. Библиотеки готовили набором NEBNext Ultra II RNA Library Prep, с использованием NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (“New England Biolabs”, США) согласно инструкции производителя. Количественные измерения РНК и ДНК проводили на флуориметре Qubit 1.0 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Секвенирование проводили с использованием платформы Illumina HiSeq4000 (“Illumina Inc.”, США) с получением не менее 25 миллионов одноконцевых чтений длиной 50 нуклеотидов. Дальнейшая обработка чтений проводилась с помощью программы CLC Genomics Workbench 7.0.3 (“Qiagen”, Нидерланды). Полученные чтения были отфильтрованы по качеству с удержанием только тех позиций, которые имели качество больше 20, и чтений с длиной более 25 и картированы на референсный геном *A. thaliana* (TAIR10) со следующими установками: доля выравниваемого участка – 100%, порог по уровню сходства – 94%, штраф за несоответствие – 2, штраф за индель – 3, допускаются только уникальные картирования. В результате было получено в среднем 22.5 миллионов высококачественных уникально картированных чтений для каждого образца. Для учета влияния размера библиотеки на уровень экспрессии гена суммарное число чтений, картированных на ген, было нормализовано с помощью метода медианы [https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8]. Анализ дифференциальной экспрессии проводился с помощью пакета “DESeq2” статистической среды R [https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8]. В качестве порога статистической значимости использовалось р-значение с поправкой на множественное тестирование FDR меньше 0.05 и уровень изменения экспрессии (fold change) более 2.

Для последующего подтверждения данных RNA-seq анализа относительный уровень транскриптов оценивали методом полимеразной цеп-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Название гена	Локус	Прямой, 5' → 3'	Обратный, 5' → 3'
<i>SAG12</i>	At5g45890	GCGGTTGCGGCTATTGAAG	CGCAGTATCCATTAACCCGC
<i>CAB2</i>	AT1G29920	TCAAGTTTGGAGAGGCAGTT	GTAACCTTCAACGGCTCCCAT
<i>SSPP</i>	At5g02760	CTGTTGGAGAATAGGTGCCG	AAACTCTCCAAAGGTGTGAA
<i>UBQ10</i>	AT4G05320	GCGTCTTCGTGGTGGTTTCTAA	GAAAGAGATAACAGGAACGGAAC

ной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ ПЦР РВ) на приборе LighCyclerR96 (“Roche”, Швейцария) согласно протоколу, описанному ранее [12]. Специфичные пары праймеров к исследуемым генам подбирали с помощью программы Vector NT11 (табл. 1). В качестве референсного гена использовали ген *UBQ10*.

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки средних. Достоверность различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью критерия Стьюдента. Данные RNA-seq представлены в виде средних значений двух биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве материала для исследования был выбран закончивший рост шестой лист 7-недельных растений, который у растений дикого типа характеризовался в этом возрасте развитием пожелтения края листовой пластинки. Этот симптом, являющийся выраженным проявлением старения листа, сопровождался существенным снижением содержания хлорофилла по сравнению с мутантными растениями. При этом повышенное содержание суммарного хлорофилла ($a + b$) в листьях мутантов *ahk2* (на 31%), *ahk2ahk3* (на 24%) и *ahk2ahk4* (на 13%) (рис. 1) примерно соответствовало увеличенным значениям максимального квантового выхода ФСП F_v/F_m [12].

Известно, что естественное старение листьев *Arabidopsis* может зависеть от инициации развития репродуктивных тканей и органов. Согласно литературным данным [14] и результатам наших предшествующих исследований [12], время выброса цветоноса нокаут-линий по рецепторам цитокининов могло отличаться от времени появления цветоносов у растений *Arabidopsis* дикого типа. Действительно, в использованных нами экспериментальных условиях растения с инактивированным рецептором АНК2 обнаружили пролонгированный период вегетации по сравнению с растениями дикого типа, что сопровождалось появлением достоверно большего количества настоящих розеточных листьев к моменту начала цветения (рис. 2а) и удлинением периода цветения (рис. 2б).

Измененным физиологическим характеристикам соответствовало кратное снижение уровня транскриптов гена *SAG12* (senescence-associated gene 12), молекулярного маркера старения, а также повышенное накопление матриц ядерных генов фотосинтетических белков *CAB2* и *LHC2.4* (табл. 2).

В общей сложности сравнение транскриптома листьев двойного мутанта *ahk2ahk3* и контрольного генотипа (дикий тип) выявило измененную экспрессию 1755 генов, причем 775 были подавлены, а 980 активированы. Оба списка генов ранжировали по количественному изменению транскрипции, при этом значимым результат считали при условии изменения экспрессии генов более чем в два раза.

Прежде всего, мы обратили особое внимание на гены сигналинга и метаболизма ЦК, экспрессия которых по литературным данным [15, 16] из-

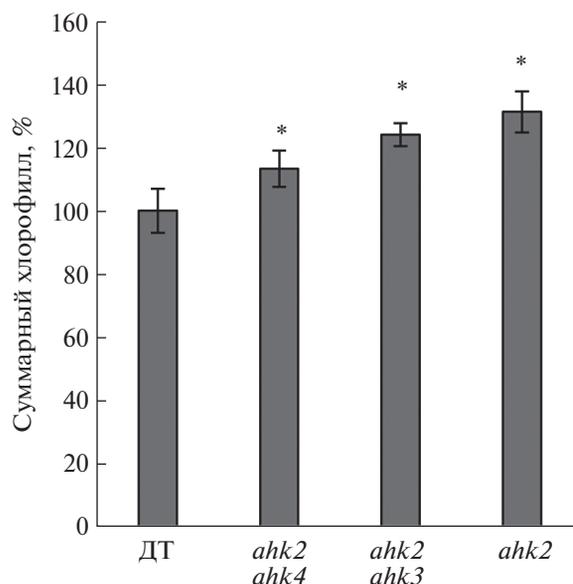


Рис. 1. Содержание суммарного хлорофилла в шестом листе 7-недельных растений дикого типа и *ahk* мутантов *A. thaliana*. Содержание суммарного хлорофилла в листьях дикого типа были приняты за 100%. Данные представлены в виде средних значений трех биологических повторностей и ошибки среднего. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента. * $P \leq 0.05$.

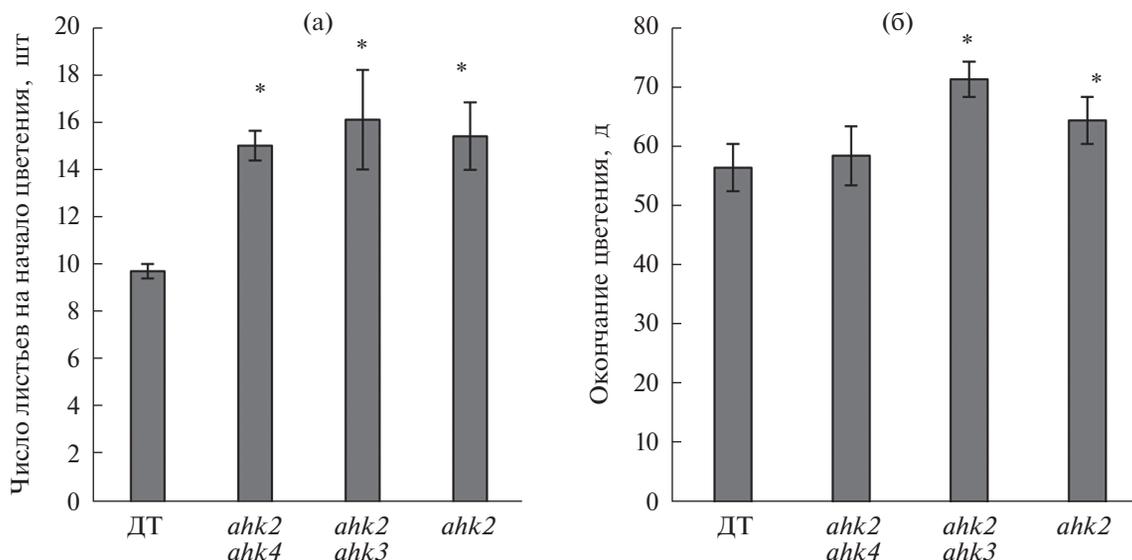


Рис. 2. Физиологические особенности растений дикого типа и *ahk* мутантов *A. thaliana*, связанные с цветением. Количество настоящих розеточных листьев на момент начала цветения (а) и дни окончания цветения (б) *ahk* мутантов *Arabidopsis*. Данные представлены в виде средних значений трех биологических повторностей и ошибки среднего. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента. * $P \leq 0.05$.

менялась в ходе старения. Среди генов, ассоциированных с синтезом ЦК, более высокий уровень экспрессии у мутанта *ahk2ahk3* был выявлен для гена *IPT3* (At3g63110), тогда как два других гена этого семейства (At2g36800 и At1g22400) были ингибированы (табл. S1). При естественном старении все эти гены экспрессировались слабо [15]. У мутанта *ahk2ahk3* были подавлены гены ЦК-оксидаз, связанные со специфичной деградацией ЦК и активируемые при естественном старении, а также гены пурипермеаз (табл. S1), ответственные за транспорт ЦК [17]. Кроме того, был снижен уровень транскриптов генов гликозилтрансфераз At2g36800 и At1g22400 (табл. S1), обеспечивающих превращение цитокининов в неактивные гликозилированные формы [18]. Напротив, экспрессия генов регуляторов ответа на ЦК типа А *ARR6*, 7, 9, которая снижалась при естественном старении, была существенно повышена, как и экспрессия гена быстрого ответа на ЦК At2g18300, кодирующего транскрипционный фактор семейства bHLH (табл. S1) [6]. Подобная регуляция ЦК-зависимых генов, контролируемых программами старения, свидетельствует о замедлении возрастных изменений у *ahk2ahk3* на молекулярном уровне и о непосредственном участии системы рецепции гормонального сигнала в этом процессе.

Пул ЦК-зависимых генов составлял лишь часть генов со специфичными изменениями экспрессии в транскрипционном профиле мутанта. В верхней части ранжированного списка транскриптов генов с активированной экспрессией у

мутанта *ahk2ahk3* наше внимание привлек ген *SSPP* (senescence-suppressed protein phosphatase), уровень экспрессии которого был повышен в 137 раз (табл. 2). Этот ген кодирует серин-треониновую протеинфосфатазу типа 2С, которая негативно регулирует естественное старение листьев у *Arabidopsis* [19]. RNA-seq анализ также показал, что аналогичный ген в транскриптоме листьев одинарного нокаут-мутанта *ahk2* экспрессировался в 27 раз выше по сравнению с диким типом, тогда как у мутанта *ahk2ahk4* отличий от дикого типа выявлено не было (табл. 2). Согласно данным сайта <http://bar.utoronto.ca/interactions/>, *SSPP* взаимодействует с белками различной локализации. Интересно, что у мутанта *ahk2/3* более чем вдвое была повышена экспрессия гена фосфоглюкомутазы *ATPGMP*, кодирующего пластидную изоформу фосфоглюкомутазы, которая связана с образованием амилопластов и оттоком углерода. Анализ транскриптома листьев мутанта *ahk2ahk3* обнаружил среди генов с активированной экспрессией также 13 генов семейства *SAUR* (*SMALL AUXIN UP RNAs*). У *Arabidopsis* семейство генов *SAUR* насчитывает в общей сложности 81 представителя, которые кодируют близкородственные РНК и белки, вовлеченные в быстрый ответ на ауксины [20]. Регуляторная роль этих белков может различаться в зависимости от физиологического состояния, типа ткани, а также воздействия различных фитогормонов [21]. У мутанта *ahk2ahk3* активация экспрессии 13 выделенных генов *SAUR* варьировала от 4 до 281 раза (табл. 2), при этом только один ген из семейства — *SAUR36* — обнаружил снижение уровня тран-

Таблица 2. Гены с наиболее значимым количественным изменением транскриптов в шестом листе 7-недельных растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и нокаут-мутантов *ahk2ahk4*, *ahk2ahk3* и *ahk2* согласно результатам RNA-seq. Жирным шрифтом выделены гены, экспрессия которых подтверждена методом ОТ ПЦР РВ

Название гена	Локус	FC*		
		<i>ahk2ahk4</i> /ДТ	<i>ahk2ahk3</i> /ДТ	<i>ahk2</i> /ДТ
Активированы				
SSPP	AT5G02760	x	137.9	27
<i>SAUR3</i>	AT4G34790	x	281.1	x
<i>SAUR29</i>	AT3G03820	x	238.2	196.7
<i>SAUR57</i>	AT3G53250	x	203.4	x
<i>SAUR1</i>	AT4G34770	x	139.6	x
<i>SAUR26</i>	AT3G03850	x	138.5	x
<i>SAUR20</i>	AT5G18020	x	19.6	x
<i>SAUR50</i>	AT4G34760	x	17.4	x
<i>SAUR7</i>	AT2G21200	x	17.1	x
<i>SAUR68</i>	AT1G29510	x	16.7	x
<i>SAUR16</i>	AT4G38860	x	15.6	x
<i>SAUR51</i>	AT1G75580	x	9.3	6.6
<i>SAUR15</i>	AT4G38850	x	6.2	x
<i>SAUR6</i>	AT2G21210	x	4.1	x
CAB2	AT1G29920	x	7.7	5.4
<i>LHCB2.4</i>	AT3G27690	x	29.6	30.3
Репрессированы				
<i>SAUR36 (SAG201)</i>	AT2G45210	x	-5.53	-5.05
SAG12	AT5G45890	-4.2	-137.5	x

* FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

скриптов. Интересно, что у мутанта *ahk2* был повышен уровень экспрессии только двух генов семейства, *SAUR29* и *SAUR51*, а у двойного мутанта *ahk2ahk4* какие-либо изменения в экспрессии генов *SAUR* отсутствовали (табл. 2). Таким образом, анализ транскриптома позволяет предположить, что пролонгированный онтогенез мутантов *ahk2* и *ahk2ahk3* может быть связан с повышенной экспрессией ряда ауксин-индуцируемых генов семейства *SAUR*, возможной мишенью которых является *SSPP*, а также ген с подавленной экспрессией *SAUR36*.

Чтобы понять молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции генов семейства *SAUR*, мы проанализировали также профили экспрессии ряда генов сигналинга и метаболизма ауксинов. Известно, что при естественном старении гены метаболизма ауксина преимущественно активируются, а гены транскрипционных репрессоров Аук/IAA и транспортеров подавляются [15]. У мутанта *ahk2ahk3* картина была несколько иной. Гены метаболизма *nitrilase 1* (At3g44310) и *aldehyde oxidase 1* (At5g20960) оказались ингибированы (табл. S2). Помимо них уменьшалось накопле-

ние транскриптов трех генов семейства GH3 – At4g37390, At4g27260 и At2g23170, кодирующих фермент IAA-амидосинтазу, который регулируют активность ауксинов (табл. S2). Вместе с тем мы выявили повышенную экспрессию генов сигналинга и транспорта ауксина *Aux/IAA29* (At4g32280), *ARF8* (At5g37020) и *PIN7* (At1g23080) (табл. S2). Значимые количественные изменения были отмечены также для транскриптов членов семейства В ABC-транспортеров ABCB1/Pgp1 (At3g28860), ABCB2/Pgp2 (At4g25960) и ABCB19/Pgp19 (At2g36910), обеспечивающих полярный транспорт ауксинов как непосредственно, так и при участии PIN белков [22]. Все это позволяет предположить их участие в передаче сигнала ИУК к генам семейства *SAUR*, которые могут быть непосредственными мишенями этого пути. Однако для выяснения деталей функционирования этого пути необходимы дополнительные исследования.

Для подтверждения полученных с помощью RNA-seq данных мы применили независимый ОТ ПЦР РВ анализ экспрессии ряда генов. Количественный ПЦР подтвердил результаты транскриптомного анализа и выявил значительную

активацию генов *SSPP* и *CAB2* в листьях мутантов *ahk2* и *ahk2ahk3* на фоне снижения экспрессии гена *SAG12* (рис. 3). При этом у мутанта *ahk2ahk4* на фоне повышенной экспрессии генов фотосинтетических белков активации гена *SSPP* обнаружено не было (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы в изучении механизмов восприятия и передачи эндогенных сигналов и выявления генов, ответственных за инициацию естественного или индуцированного старения листьев, достигнут большой прогресс, который стал возможен благодаря интенсивному развитию методов геномики. Однако, несмотря на значительные успехи и понимание роли рецепторов цитокинина в контроле процесса естественного старения листьев *A. thaliana*, конкретные молекулярные мишени действия ЦК остаются неизвестными.

В данном исследовании, используя данные секвенирования транскриптомов и их последующую оценку методом ПЦР в режиме реального времени мы показали, что пролонгированный онтогенез у мутанта *ahk2ahk3* сопровождался снижением экспрессии *SAUR36*, позитивного регулятора старения, и резким повышением экспрессии гена *SSPP* (AT5G02760), негативно регулирующего естественное старение листьев у *Arabidopsis*, а также 13 генов из семейства *SAUR*, кодирующих белки ответа на ауксины.

Из литературы известно, что уровень транскриптов гена *SSPP* значительно снижается как при естественном, так и при индуцированном внешними факторами старении [19]. Особенностью продукта гена *SSPP* является его способность непосредственно взаимодействовать с цитоплазматическим доменом серин-треониновой рецепторной киназы SARK (receptor-like kinase) и дефосфорилировать его, задерживая тем самым старение листьев [19]. Ранее было показано, что ген *SARK* (At4g30520), кодирующий рецепторную киназу с лейциновыми повторами (LRR), положительно регулирует старение листьев у *Arabidopsis* и относится к группе *SAG* генов [23]. Однако профилирование транскриптомов *ahk* мутантов не выявило изменений в экспрессии гена *SARK*.

Известно, что в задержку старения, индуцированного *SSPP*, вовлечен сигналинг цитокинина, в частности рецептор АНК3 [24]. Такой вывод был сделан на основании фенотипического анализа двойного мутанта *ahk3-3/SSPPox*, который утрачивал способность к задержке старения листьев при инактивации гена *АНК3*. Трансгенное растение *Arabidopsis* 35S:*SSPP* характеризовалось гиперчувствительностью к экзогенным цитокинам, которая исчезала при дополнении нокаутированным геном *АНК3*. Тем не менее, согласно

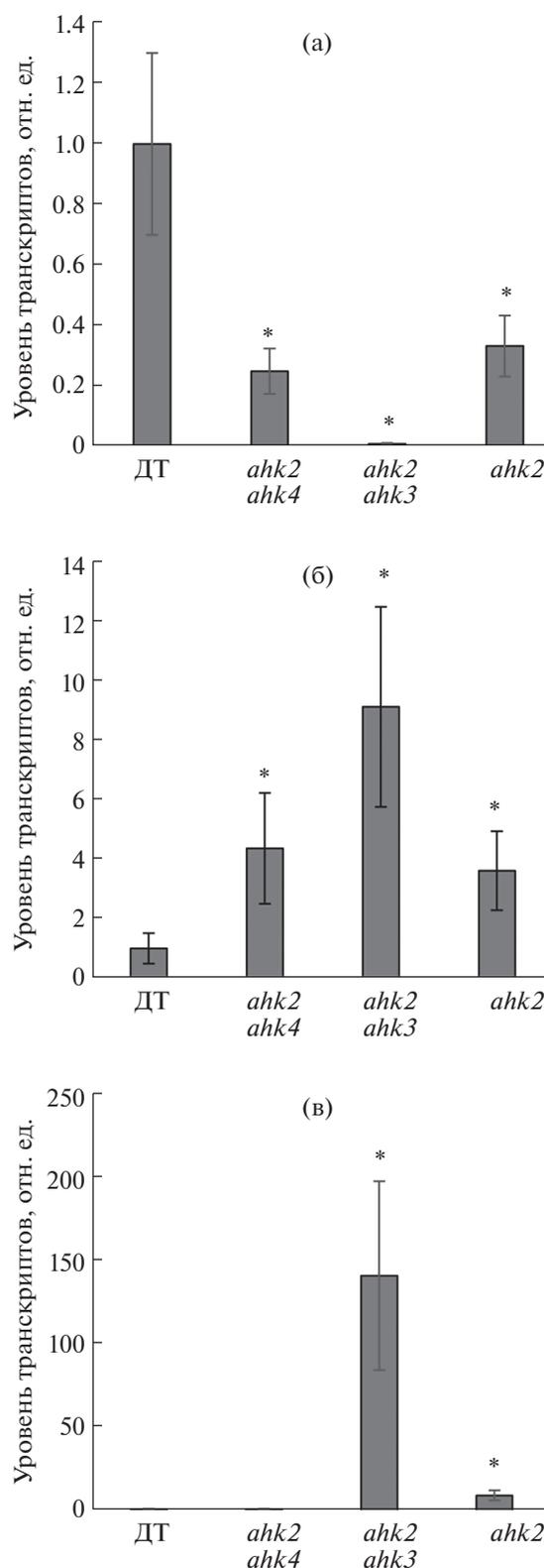


Рис. 3. Уровень транскриптов генов *SAG12* (а), *CAB2* (б) и *SSPP* (в) в шестом листе 7-недельных растений дико-го типа и *ahk* мутантов *A. thaliana*. Данные представлены в виде средних значений трех биологических повторностей и ошибки среднего. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента. * $P \leq 0.05$.

результатам ДНК-микрочипирования, доступным на *Arabidopsis* e-FP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), экспрессия гена *SSPP* не регулируется цитокинином, но в значительной степени активируется индолилуксусной кислотой.

Механизм регуляции гена *SSPP* ауксинами подробно изучался в работе Wen с соавт. [25]. Как оказалось, белок SAUR49 способен непосредственно взаимодействовать с *SSPP* и подавлять его активность, тем самым ускоряя старение листьев *Arabidopsis* через SARK-зависимый сигнальный путь. При этом гиперэкспрессия гена *SAUR49* значительно ускоряла как естественное старение, так и старение листьев *Arabidopsis*, индуцированное темнотой. Согласно результатам двугибридного анализа, помимо SAUR49, с *SSPP* взаимодействовали еще 4 представителя семейства SAUR белков: SAUR30, 39, 41, 72. Вероятно, эти представители семейства SAUR являются интеграторами положительной регуляции старения листьев *Arabidopsis* [25]. К их числу относится также ауксин-активируемый *SAUR36*, экспрессия которого возрастала по мере развития симптомов старения [26].

Следует, однако, заметить, что среди 13 генов *SAUR*, активированных у мутанта *ahk2ahk3*, отсутствовали гены, продукты которых взаимодействовали бы с *SSPP*. Более того, избирательная активация генов *SAUR* сопровождалась усилением экспрессии гена *SSPP* (табл. 2) и пролонгированным онтогенезом мутантов *ahk2* и *ahk2/3*. При этом почти все выделенные нами гены *SAUR* относились к числу активируемых ИУК, тогда как гены белков, взаимодействовавших с *SSPP*, могли не отвечать на ауксины (*SAUR30*, 39, 49) или даже ингибировались ими (*SAUR72*) [27]. Таким образом, различные представители семейства SAUR действовали как антагонисты, что характерно также и для членов семейств ARF и ARR [27]. Интересно, что помимо реакции на ауксины почти все гены *SAUR*, обнаружившие повышенную экспрессию у мутанта *ahk2ahk3*, активировались гиббереллинами и частично брассиностероидами, то есть гормонами, стимулирующими рост [27]. Это отличало их от генов *SAUR* – положительных регуляторов старения. Более того, представители последней группы активировались АБК в отличие от выделенных нами *SAUR* генов, замедлявших старение, которые ингибировались этим гормоном или не отвечали на его воздействие. Все это позволяет заключить, что система SAUR-зависимой регуляции старения является композитной, причем различные представители семейства способны обеспечить положительную или негативную регуляцию старения листьев в зависимости от генетической среды и внешних стимулов.

Как отмечалось выше, цитокинин-зависимый контроль продолжительности жизни листьев осуществляется рецептором АНК3 через фосфори-

лирование транскрипционного фактора ARR2. Инактивация гена *АНК3* ускоряет старение листьев, тогда как gain-of-function мутации *ore12-1* и *rock3*, обеспечивающие усиление функции этого гена, приводят к замедлению старения [11, 28]. Одновременная инактивация двух рецепторов ЦК у мутанта *ahk2ahk3* оказывает плейотропный эффект на физиологическое состояние растения, включая появление полукарликового фенотипа, повышенное содержание эндогенных цитокининов зеатинового ряда, задержку цветения, и пролонгированный онтогенез [7, 12]. Мы предполагаем, что задержка старения листьев и пролонгированный онтогенез мутанта *ahk2ahk3*, а также одинарного мутанта *ahk2* обусловлены измененной экспрессией набора ауксин-чувствительных генов, негативно регулирующих старение листьев. Помимо выявленных нами *SAUR* генов, в состав этого модуля, возможно, входят гены транспорта и сигналинга ауксина *PIN7* (At1g23080), *Aux/IAA29* (At4g32280) и *ARF8* (At5g37020), однако для доказательства их прямого участия необходимы дополнительные тесты.

Полученные результаты наводят на мысль, что при частичном подавлении сигналинга ЦК основная роль в контроле естественного старения растения и его листьев переходит к ауксиновому сигналингу, одной из мишеней которого является ген *SSPP*. Таким образом, мы приходим к парадоксальным результатам, когда при подавлении сигналинга ЦК наблюдается замедление старения. Как известно, любая биологическая функция реализуется несколькими независимыми механизмами [29] и именно с таким параллелизмом, повышающим вероятность выполнения функции (и весьма эффективно), мы сталкиваемся при анализе особенностей старения мутанта *ahk2ahk3*. Появление подобных компенсаторных механизмов заставляет с известной сдержанностью относиться к результатам, полученным методами обратной генетики, так как в основе видимых эффектов может лежать не прямое нарушение функции исследуемого гена, а возникновение альтернативных путей ее реализации. О возможном включении компенсаторных механизмов при деэтиоляции тройного мутанта по регуляторам ответа на ЦК *arr1arr10arr12* сообщали Cortleven с соавт. [30]. Увеличенный синтез хлорофилла у мутанта с инактивированным сигналингом ЦК авторы связывали с экспрессией транскрипционных факторов, принадлежащих к альтернативным системам регуляции формирования хлоропластов, напрямую не связанных с ЦК.

В пользу множественности путей реализации программ старения свидетельствует и транскриптомный профиль нокаут-мутанта *ahk2ahk4* с пролонгированным периодом вегетации. Замедление скорости старения листьев этого мутанта не было связано с изменением экспрессии модуля *SSPP*-

SAUR и, очевидно, определялось активацией АНК3-зависимых мишеней.

Таким образом, анализ транскриптома мутанта *ahk2ahk3* позволяет заключить, что в основе задержки естественного старения листьев растений могут лежать антагонистические взаимоотношения цитокинина и ауксина. При этом инактивация индивидуальных рецепторов цитокинина (прежде всего, АНК2 и АНК3) способствует перепрограммированию экспрессии генома и включению компенсаторных механизмов, связанных с активацией ауксин-зависимых генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 18-74-00135. Секвенирование и биоинформатический анализ данных секвенирования проводились в ЦКП геномики Сколковского института науки и технологии.

Авторы выражают благодарность руководителю ЦКП геномики Сколковского института науки и технологии к.б.н. Логачевой М.Д. за оказанную помощь при проведении данного исследования.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nooden L.D.* Senescence and aging in plants. Academic Press, 1998. 564 p.
2. *Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D.* The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach // *Plant Biotechnol. J.* 2003. V. 1. P. 3.
3. *El-Showk S., Ruonala R., Helariutta Y.* Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk // *Development.* 2013. V. 140. P. 1373. <https://doi.org/10.1242/dev.086371>
4. *Miller C.O., Skoog F., von Saltz N.M., Strong F.M.* Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 1329.
5. *Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J.* The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // *Plant Cell.* 2015. V. 27. P. 44. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
6. *Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I., Bürkle L., Schmölling T.* Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades // *Plant J.* 2005. V. 44. P. 314.
7. *Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling T.* Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development and cytokinin metabolism // *Plant Cell.* 2006. V. 18. P. 40.
8. *Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T.* In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 8821.
9. *Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. С. 295.
10. *Kieber J.J., Schaller G.E.* Cytokinin signaling in plant development // *Development.* 2018. V. 145: dev149344. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
11. *Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I.* Cytokinin-mediated control of leaf longevity by АНК3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 814.
12. *Danilova M.N., Kudryakova N.V., Doroshenko A.S., Zabrodin D.A., Rakhmankulova Z.F., Oelmüller R., Kusnetsov V.V.* Opposite roles of the Arabidopsis cytokinin receptors АНК2 and АНК3 in the expression of plastid genes and genes for the plastid transcriptional machinery during senescence // *Plant Mol. Biol.* 2017. V. 93. P. 533. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0580-6>
13. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Meth. Enzymol.* 1987. V. 148. P. 350.
14. *Igarashi D., Izumi Y., Dokiya Y., Totsuka K., Fukusaki E., Ohsumi C.* Reproductive organs regulate leaf nitrogen metabolism mediated by cytokinin signal // *Planta.* 2009. V. 229. P. 633. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0858-2>
15. *van der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flügge U.I., Kunze R.* Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 776.
16. *Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J.* Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis // *Plant J.* 2005. V. 42. P. 567.
17. *Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W.B.* Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis // *Plant J.* 2003. V. 34. P. 13.
18. *Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J.* N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of Arabidopsis thaliana // *J Biol Chem.* 2004 V. 46 P. 47822-32.
19. *Xiao D., Cui Y., Xu F., Xu X., Gao G., Wang Y., Guo Z., Wang D., Wang N.N.* SENESCENCE-SUPPRESSED PROTEIN PHOSPHATASE directly interacts with the cytoplasmic domain of SENESCENCE-ASSOCIATED RECEPTOR-LIKE KINASE and negatively regulates leaf senescence in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 1275. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01112>
20. *Hagen G., Guilfoyle T.* Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors // *Plant Mol. Biol.* 2002 V. 49. P. 373.

21. *van Mourik H., van Dijk A.D.J., Stortenbeker N., Angenent G.C., Bemer M.* Divergent regulation of Arabidopsis SAUR genes: a focus on the SAUR10-clade // *BMC Plant Biol.* 2017. V. 17. P. 245.
<https://doi.org/10.1186/s12870-017-1210-4>
22. *Hellsberg E., Montanari F., Ecker G.F.* The ABC of phytohormone translocation // *Planta Med.* 2015.V. 6. P. 474.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1545880>
23. *Xu F., Meng T., Li P., Yu Y., Cui Y., Wang Y., Gong Q., Wang N.N.* A soybean dual-specificity kinase, Gm-SARK, and its Arabidopsis homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 2131.
24. *Wang Y., Zhang X., Cui Y., Li L., Wang D., Mei Y., Wang N.N.* AHK3-mediated cytokinin signaling is required for the delayed leaf senescence induced by SSPP // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: e2043.
<https://doi.org/10.3390/ijms20082043>
25. *Wen Z., Mei Y., Zhou J., Cui Y., Wang D., Wang N.N.* SAUR49 can positively regulate leaf senescence by suppressing SSPP in Arabidopsis // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 61P. 644.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcz231>
26. *Hou K., Wu W., Gan S.S.* SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2013. V. 161. P. 1002.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.212787>
27. *Ren H., Gray W.M.* SAUR Proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1153.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.003>
28. *Bartrina I., Jensen H., Novák O., Strnad M., Werner T., Schmülling T.* Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 1783.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01903>
29. *Скулачев В.П.* Старение организма – особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование гипотезы Вейсмана // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 1394.
30. *Cortleven A., Marg I., Yamburenko M.V., Schlicke H., Hill K., Grimm B., Schaller G.E., Schmülling T.* Cytokinin regulates the etioplast-chloroplast transition through the two-component signaling system and activation of chloroplast-related genes // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 464.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00640>