



УДК 581.1

<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.3>

## Характеристика суспензионных культур клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh с изменённой экспрессией гена альтернативной оксидазы митохондрий *AOX1a* и анализ их морозостойчивости

А. В. Степанов<sup>1</sup>, С. А. Кашин<sup>2</sup>, Н. С. Забанова<sup>1,2</sup>,  
О. А. Федотова<sup>1</sup>, А. В. Федяева<sup>1</sup>, И. В. Любушкина<sup>1,2</sup>,  
Т. П. Побежимова<sup>1</sup>, О. И. Грабельных<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup> Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

E-mail: [rolga@sifibr.irk.ru](mailto:rolga@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** Представлена характеристика гетеротрофных суспензионных культур клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, полученных из семян растений дикого типа (экотип Columbia, Col-0), а также двух линий с изменённой (сниженной (линия AS-12) и повышенной (линия XX-2)) экспрессией гена альтернативной оксидазы митохондрий *AOX1a*. Определены различия между изученными линиями в содержании митохондриальных белков дыхательной цепи (АОХ, СОХII, NDB) и разобщающего белка (UCP), а также по интенсивности образования активных форм кислорода (АФК). Изучена жизнеспособность клеток культур трёх линий при воздействии отрицательных температур с различной длительностью экспонирования. Сделаны выводы о значении альтернативной оксидазы в развитии морозостойчивости растительной клетки.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, суспензионная культура клеток, дыхание, альтернативная оксидаза, *AOX1a*, активные формы кислорода.

**Для цитирования:** Характеристика суспензионных культур клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh с изменённой экспрессией гена альтернативной оксидазы митохондрий *AOX1a* и анализ их морозостойчивости / А. В. Степанов, С. А. Кашин, Н. С. Забанова, О. А. Федотова, А. В. Федяева, И. В. Любушкина, Т. П. Побежимова, О. И. Грабельных // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2021. Т. 35. С. 3–18. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.3>

### Введение

Фермент альтернативная цианид-резистентная оксидаза (АОХ) принимает участие в процессах адаптации растений к различным неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам [Vanlerberghe, 2013]. АОХ отщепляется от основной цитохромной цепи митохондрий на уровне убихинона, не обладает способностью к переносу протонов, и энергия потока электронов через АОХ высвобождается в виде тепла. Среди пяти генов АОХ (*AOX1a-d*, *AOX2*) *Arabidopsis thaliana* в условиях стресса или воздействия специфических ингибиторов дыхания митохондрий активируется экспрессия гена *AOX1a* [Clifton, Millar, Whelan, 2006; The plant energy-dissipating ... , 2006].

Одной из функций АОХ у растений является предотвращение образования активных форм кислорода (АФК) [Maxwell, Wang, McIntosh, 1999; Blokhina, Fagerstedt, 2010]. Генерацию АФК в растительной клетке вызывают низкие температуры [Suzuki, Mittler, 2006]. Реализация антиоксидантной функции АОХ благоприятствует выживаемости растительных клеток при действии низких температур [Fiorani, Umbach, Siedow, 2005; Overexpression of wheat ... , 2006; Alternative oxidase involvement ... , 2007; Антиоксидантная функция альтернативной ... , 2011; Impact of mitochondrial ... , 2011; Митохондриальные энергорассеивающие системы ... , 2014].

У растений арабидопсиса, у которых экспрессия *AOX1a* отсутствовала (линия *AOX1a* knock-out), в ответ на снижение температуры наблюдали увеличение цианид-чувствительного дыхания и экспрессию генов *NDB2* и *UCP1*, тогда как у дикого типа происходила значительная экспрессия мРНК *AOX1a* и увеличение цианид-резистентного дыхания [The lack of ... , 2008]. У растений табака с сильной супрессией *AOX1a* также наблюдали усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов и снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов при холодной обработке [Impact of mitochondrial ... , 2011]. Эти данные свидетельствуют о том, что АОХ является важным компонентом антиоксидантной защитной системы клеток растений, а снижение её активности приводит к увеличению экспрессии других защитных генов при низкой температуре.

Ранее на растениях арабидопсиса, трансформированных конструкциями, несущими ген *AOX1a* под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты SAMV 35S в сенсовой и антисенсовой ориентациях [Umbach, Fiorani, Siedow, 2005], и полученных из этих растений суспензионных культурах клеток были выявлены различия метаболизма, связанные с функционированием АОХ [Modified alternative oxidase ... , 2012]. Если изменения в активности АОХ не влияли на содержание АФК или чувствительность к окислительному стрессу в целом растении, то в суспензионной культуре клетки, сверхэкспрессирующие *AOX1a*, имели низкое, а АОХ-дефицитные клетки – повышенное по сравнению с диким типом содержание АФК. Интересно, что при обработке прооксидантами увеличение содержания АФК и снижение жизнеспособности клеток было сильнее выражено в культуре клеток, сверхэкспрессирующих *AOX1a* [Modified alternative oxidase ... , 2012]. Нами было показано, что растения арабидопсиса как с повышенной (линия XX-2), так и со сниженной экспрессией *AOX1a* (линия AS-12) имеют большую по сравнению с диким типом морозоустойчивость [Change of *AOX1a* ... , 2016]. Сохраняется ли обнаруженная тенденция в ответной реакции растений с изменённой экспрессией *AOX1a* на действие отрицательной температуры в суспензионной культуре клеток, до сих пор неизвестно.

Целью настоящей работы стало определение характеристик суспензионных культур клеток *A. thaliana*, полученных из семян растений со сниженной и повышенной экспрессией гена *AOX1a*, и изучение их жизнеспособности при действии отрицательной температуры.

### **Материалы и методы**

В работе использовали гетеротрофные суспензионные культуры клеток *A. thaliana* (L.) Heynh. трёх линий: дикого типа (экотип Columbia, Col-0), линий AS-12 (со сниженной экспрессией гена *AOX1a*) и XX-2 (с повышенной экспрессией *AOX1a*). Суспензионные культуры клеток с изменённой экспрессией гена *AOX1a* получали из семян арабидопсиса ранее охарактеризованных [Umbach, Fiorani, Siedow, 2005; Modified alternative oxidase ... , 2012] линий AS-12 (NASC, N6707) и XX-2 (NASC, N6591).

Семена стерилизовали 20%-ным хлорсодержащим средством «Белизна» с 0,1%-ным Тритоном X-100, высаживали на агаризованную среду Мурасиге – Скуга (MS-среда) и проращивали при 26 °С в темноте до образования каллусов, из которых получали суспензионную культуру клеток. Культуры выращивали на MS-среде при 26 °С при перемешивании и пересаживали каждые 14 дней с разведением свежей средой в 6 раз. Для экспериментов использовали 8-суточную культуру. Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали данные по сухой биомассе, доле живых клеток, содержанию АФК и дыханию. Прирост биомассы оценивали на 0–18-е сутки роста через каждые трое суток.

Клетки суспензионной культуры подвергали воздействию отрицательной температуры -10 °С (длительность экспонирования 3, 6 и 9 ч) в объёме суспензии 5 мл в трёхсекционных чашках Петри (диаметр 90 мм, высота 14 мм) в инкубаторе MIR-154 (Sanyo, Япония).

Жизнеспособность клеток и продукцию АФК оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии, которую проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserverZ1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCamMRm3 и пакетом программного обеспечения для анализа изображений AxioVision rel. 4.7.

Жизнеспособность клеток оценивали сразу после действия отрицательной температуры и последующей инкубации в течение 48 ч при 26 °С. Суспензию клеток (100 мкл) инкубировали в присутствии флуоресцеин диацетата (FDA, 50 мкМ) (Sigma-Aldrich, США) и пропилий йодида (PI, 7,5 мкМ) (Biotium-Uniscience, США) [Изучение цитотоксичности гербицидов ... , 2019] в течение 2 мин в темноте при 26 °С. Свечение FDA оценивали с использованием Filter set 10 (EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 515-565), а PI с использованием Filter set 15 (EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590). Жизнеспособность рассчитывали как долю живых (флуоресцирующих в зелёном канале) клеток от общего числа клеток на фотографии, выраженную в процентах.

Генерацию АФК в клетках культуры определяли с помощью 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата ( $H_2DCF-DA$ , 5 мкМ) (Fluka Biochemika, Дания) [Изучение цитотоксичности гербицидов ... , 2019]. Суспензию клеток (100 мкл) инкубировали с  $H_2DCF-DA$  при 26 °С в темноте в течение 10 мин. Интенсивность флуоресценции DCF оценивали в зелёном канале с использованием Filter set 10 (EX BP 450-490, BS FT 510, EM BP 565). Для каждого образца культуры анализировали по 10 микрофотографий с помощью программы анализа изображений Image J. На каждой фотографии выбирали

10 самых ярких точек и 10 точек фона рядом с этими клетками, значения которых суммировали.

Митохондрии выделяли из клеток суспензионной культуры с помощью дифференциального центрифугирования согласно J. Davy de Virville с соавторами [Isolation and properties ... , 1994]. Концентрацию белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури. Скорость поглощения кислорода митохондриями определяли полярографически кислородным электродом Кларка, используя Oxytherm Oxygen Electrode Unit System (Hansatech Inst., Англия) в ячейке объемом 1,4 мл при 25 °С. Реакционная среда содержала 300 мМ сахарозы, 18 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,06 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 %-ный БСА и 1 мМ НАДН. Окислительное фосфорилирование инициировали добавлением 100 мкМ АДФ. Для ингибирования комплекса I дыхательной цепи использовали 0,003 мМ ротенона, цитохромоксидазы – 0,4 мМ KCN, АOX – 1 мМ бензгидроксамовой кислоты (БГК). Из полярограмм рассчитывали скорость поглощения кислорода в состоянии 3 ( $V_3$ ) и вклад (в %) цитохромного (ЦП) и альтернативного путей (АП) в дыхание. Вклад ЦП оценивали как дыхание, ингибируемое KCN, а вклад АП как дыхание, ингибируемое БГК в присутствии KCN.

Для оценки содержания белка АOX и других белков суспензию митохондрий инкубировали 30 мин на льду с 50 мМ дитиотреитола, затем митохондрии осаждали при 15 000 g в течение 15 мин. Далее проводили подготовку образца для электрофореза, электрофорез в 12,5%-ном ПААГ с ДДС–Na и иммуноблоттинг согласно Т. П. Побежимовой с соавторами [Побежимова, Колесниченко, Грабельных, 2004] с антителами против порина (VDAC), NDA и NDB, UCP1/2, АOX согласно О. И. Грабельных с соавторами [Митохондриальные энергорассеивающие системы ... , 2014] и COXII (AS04 053A, Agrisera, Швеция).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 14.0. Эксперименты повторяли не менее чем три раза. Данные представлены в виде  $M \pm S.D.$  или Me [25 %; 75 %]. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. В случае нормального распределения для доказательства наличия значимых различий между средними значениями применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующей процедурой множественного сравнения средних по методу LSD Фишера. Для доказательства наличия значимых различий при распределении, отличном от нормального, использовали Н-критерий Краскела – Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Ранее нами было выявлено, что растения арабидопсиса с повышенной и сниженной экспрессией *AOX1a* (линии AS-12 и XX-2) проявляли более высокую базовую морозоустойчивость по сравнению с диким типом [Change of *AOX1a* ... , 2016]. Повышение морозоустойчивости растений со сниженной экспрессией *AOX1a*, по-видимому, объясняется компенсаторным эффектом,

связанным с активацией других защитных механизмов, в частности активацией ферментов антиоксидантной защиты, как было показано на других растительных моделях [The lack of ... , 2008; Impact of mitochondrial ... , 2011]. Предстояло выяснить, сохраняются ли обнаруженные различия в морозоустойчивости в суспензионных культурах клеток изучаемых линий. Для этого были получены и охарактеризованы суспензионные культуры клеток арабидопсиса линий AS-12 и XX-2, а также изучена их реакция на действие отрицательной температуры.

На рисунке 1 представлен темп роста суспензионных культур клеток арабидопсиса дикого типа (Col-0), линий AS-12 и XX-2. Культуральные линии AS-12 и XX-2 характеризуются более высокими темпами роста, тогда как выход в стационарную фазу и фазу деградации раньше наступает у Col-0, чем у линий с изменённой экспрессией *AOX1a*.

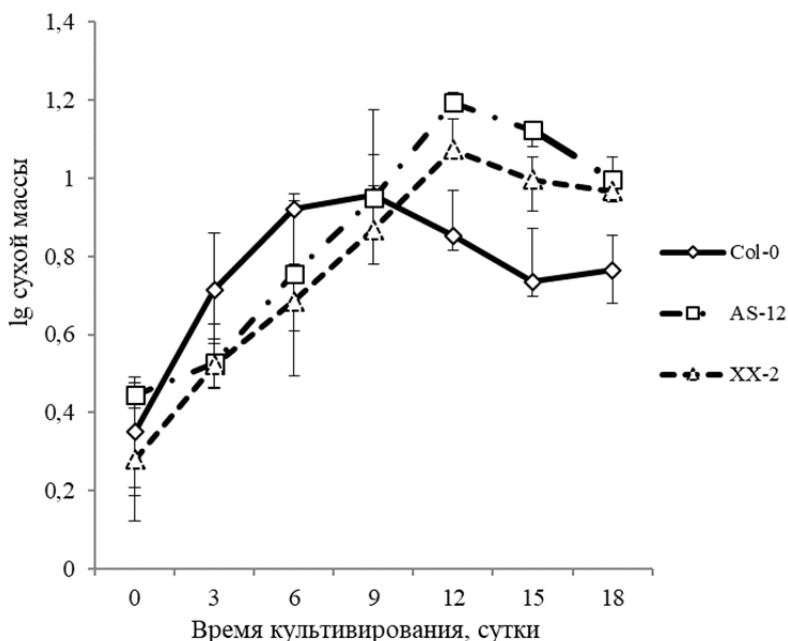


Рис. 1. Темп роста суспензионных культур клеток арабидопсиса дикого типа (Col-0), линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) и линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2). Полученные значения сухой биомассы пересчитаны в г/л питательной среды и представлены в виде десятичного логарифма (lg) сухой массы (Me [25 %; 75 %], n = 4–8).

Анализ белковых спектров митохондрий, изолированных из суспензионных культур клеток арабидопсиса дикого типа и линий с изменённой экспрессией *AOX1a*, выявил различия в содержании ряда митохондриальных белков между изученными линиями (рис. 2). Результаты иммуноблоттинга подтверждают, что в митохондриях клеток суспензионной культуры XX-2,

полученной из семян растений с повышенной экспрессией *AOX1a*, содержание белка АОХ повышено по сравнению с культурой клеток дикого типа, а в клетках культуры AS-12 из семян растений со сниженной экспрессией гена *AOX1a* – снижено.

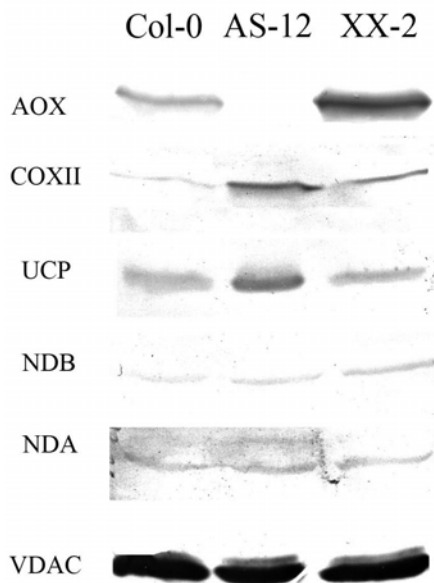


Рис. 2. Содержание белков дыхательной цепи (АОХ, СОХII, NDA, NDB) и разобщающего белка (UCP) в митохондриях, изолированных из суспензионных культур клеток арабидопсиса дикого типа (Col-0), линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) и линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2), выращенных при 26 °С. Содержание белка наружной мембраны митохондрий VDAC служит внутренним контролем. Представлен типичный иммуноблот

Одновременно со снижением содержания белка АОХ в культуре клеток линии AS-12 наблюдали увеличение содержания разобщающего белка UCP и субъединицы II цитохромоксидазы СОХII (см. рис. 2). Значительных различий в содержании белков альтернативных НАД(Ф)Н дегидрогеназ (внутренних NDA и внешних NDB) между изучаемыми линиями не обнаружено, отмечено лишь некоторое увеличение содержания NDB у линии XX-2. В литературе имеются сведения об увеличении содержания разобщающего белка и усилении скорости цианид-чувствительного дыхания у растений арабидопсиса с выключенной экспрессией *AOX1a* в ответ на снижение температуры [The lack of alternative oxidase ... , 2008]. Накопление транскриптов генов *AtPUMP4* и *AtPUMP5* происходило в начальный период действия низкой положительной температуры [The plant energy-dissipating ... , 2006]. Повышение содержания *AtPUMP* также наблюдали в культуре клеток *Araucaria angustifolia* в ответ на холодовой стресс [The involvement of PUMP ... ,

2012]. Поскольку одной из функций разобщающих белков у растений является предотвращение образования АФК [The plant energy-dissipating ... , 2006], наблюдаемое нами повышение содержания UCP на фоне снижения содержания АОХ в митохондриях арабидопсиса линии AS-12, по-видимому, нужно рассматривать как проявление действия компенсаторного механизма, ответственного за устойчивость к окислительному стрессу.

Результаты полярографического анализа показывают, что вклады ЦП и АП в дыхание митохондрий дикого типа и линий с изменённой экспрессией *AOX1a* существенно различаются (табл. 1). В митохондриях из культуры клеток линии XX-2 вклад ЦП в дыхание ниже, чем у дикого типа (Col-0), а вклад АП выше, чем у Col-0, что согласуется с повышенным содержанием белка АОХ в клетках культуры линии XX-2 (см. рис. 2). В отличие от линии дикого типа, в клетках суспензионной культуры AS-12 был снижен вклад АП в дыхание, а вклад ЦП не изменялся.

Таблица 1

Результаты полярографического анализа митохондрий, изолированных из клеток суспензионных культур арабидопсиса дикого типа (Col-0), линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) и линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2)

Вариант	$V_3$ , нмоль $O_2$ /(мин·мг белка)	Вклад ЦП в дыхание, %	Вклад АП в дыхание, %
Col-0	$31,56^a \pm 2,16$	$63,72^a \pm 2,15$	$19,24^a \pm 0,05$
AS-12	$26,79^b \pm 1,45$	$61,29^a \pm 8,92$	$10,42^b \pm 1,01$
XX-2	$32,49^a \pm 1,30$	$9,10^b \pm 6,18$	$54,82^c \pm 3,04$

Примечание. Вклад ЦП оценивали в процентах как дыхание, ингибируемое 0,4 мМ KCN, а вклад АП как дыхание, ингибируемое 1 мМ БГК в присутствии 0,4 мМ KCN. За 100 % принимали  $V_3$  до добавления ингибиторов. Статистически значимые различия при  $p < 0,05$  отмечены различными индексами <sup>a-c</sup> (M±S.D., n = 3).

Изменения в содержании белка АОХ и вкладе АП в дыхание митохондрий у линий с изменённой экспрессией *AOX1a* сопровождалось изменениями в генерации АФК в клетках суспензионной культуры. При этом уровень генерации АФК, отслеживаемый по флуоресценции DCF, у линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) и линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2) был значимо ниже, по сравнению с клетками дикого типа.

Изучение устойчивости клеток суспензионных культур к действию температуры -10 °С проводили с помощью флуоресцентных зондов FDA и PI, при этом долю живых клеток рассчитывали как долю FDA-положительных и PI-отрицательных клеток (рис. 4). Как видно из рисунка, в контрольных условиях в суспензионных культурах с изменённой экспрессией гена *AOX1a*, особенно у линии XX-2, доля живых клеток выше, чем в культуре дикого типа.

Следует отметить, что потребовался подбор условий обработки суспензионной культуры отрицательной температурой, которые бы приводили к стабильно повторяющемуся результату. Это было связано с тем, что в питательной среде, используемой при культивировании клеток, содержится сахара, обладающая криопротекторным действием. Немаловажное значение

имеет также плотность культуры, что может влиять на концентрацию сахаразы в растворе и определять результат эксперимента.

Действию отрицательной температуры подвергали суспензионные культуры клеток, находящиеся в трёхсекционных чашках Петри, каждая из секций которых содержала одну из трёх изучаемых культур. Такие условия гарантировали сходное действие температурного фактора на культуру клеток. По окончании воздействия отрицательной температуры суспензию культур переносили из чашек в колбы и инкубировали в контрольных условиях при 26 °С в течение 48 ч для определения последствий температуры на жизнеспособность клеток.

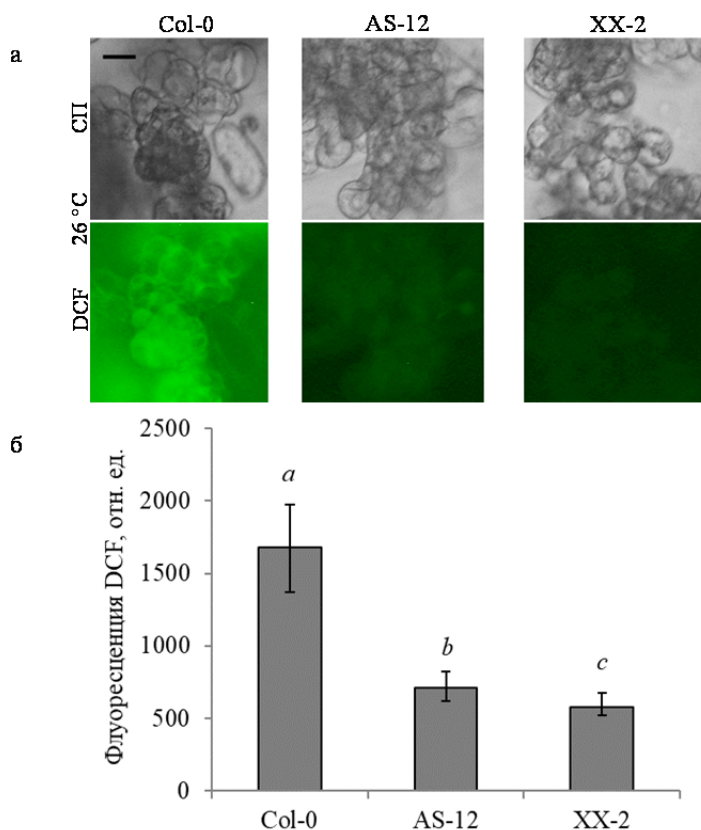


Рис. 3. Генерация АФК в клетках суспензионных культур арабидопсиса дикого типа (Col-0), линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) и линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2) в контрольных условиях (26 °С). *a* – микрофотографии клеток суспензионных культур; *b* – показатели интенсивности флуоресценции DCF. СП – светлое поле. Масштабная линейка – 20 мкм. Статистически значимые различия при  $P < 0,05$  отмечены различными индексами <sup>a-c</sup> (Me [25 %; 75 %],  $n = 10$ )



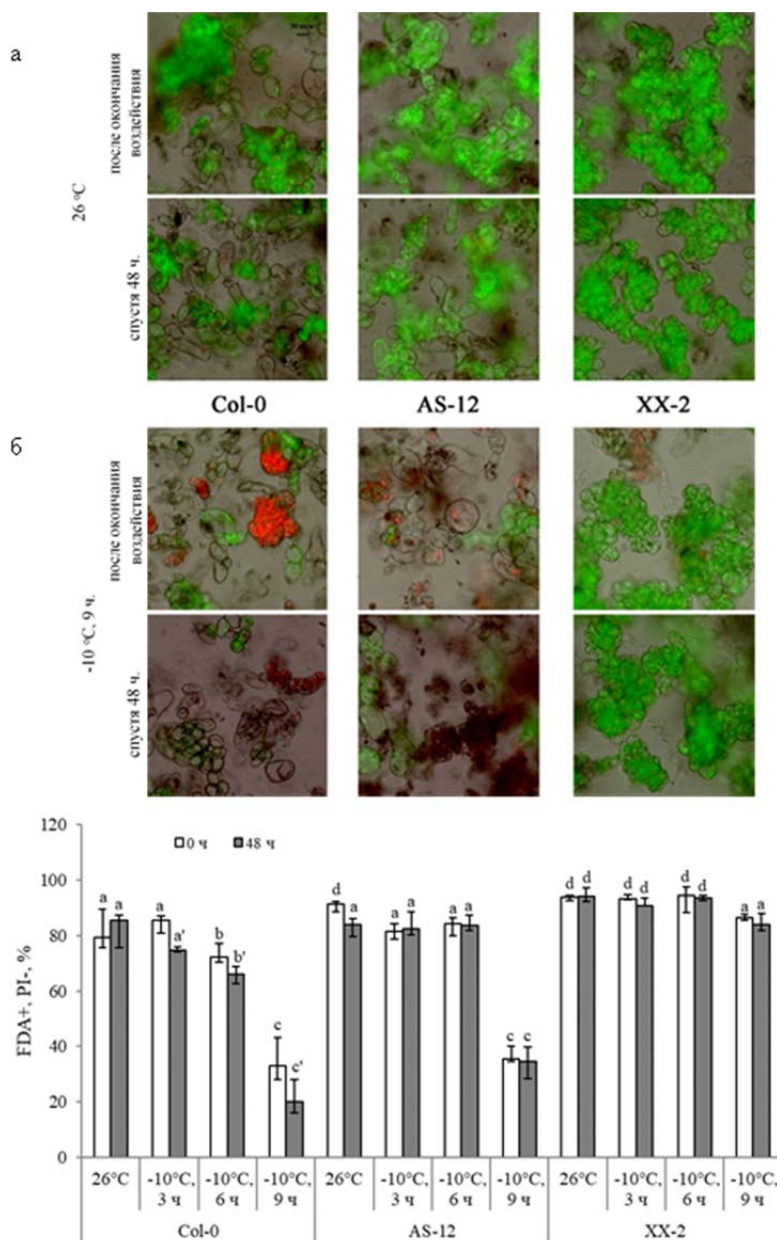


Рис. 4. Жизнеспособность клеток суспензионных культур арабидопсиса дикого типа (Col-0), линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) и линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2) после окончания воздействия температуры -10 °С (длительность экспонирования 3, 6 и 9 ч) и через 48 ч после переноса в контрольные условия 26 °С. *а* – микрофотографии клеток суспензионных культур при воздействии -10 °С, длительность экспонирования 9 ч; *б* – количественный анализ доли живых клеток с помощью FDA и PI. Масштабная линейка – 20 мкм. Статистически значимые различия при  $p < 0,05$  отмечены различными индексами <sup>a-c</sup>. Представлены данные одного независимого эксперимента (Me [25 %; 75 %],  $n = 4$ )

Полученные результаты свидетельствуют, что наиболее значительному воздействию отрицательной температуры подвергались клетки суспензионной культуры дикого типа (Col-0) (см. рис. 4). Длительная (в течение 9 ч) низкотемпературная обработка позволила выявить существенные отличия в жизнеспособности клеток культуры дикого типа и линий с изменённой экспрессией гена *AOX1a*. Клетки линии XX-2 с повышенным содержанием АОХ оказались более устойчивыми к действию отрицательной температуры по сравнению с клетками дикого типа и линии AS-12. Однако в то время, как доля живых клеток в культуре линии AS-12 через 48 ч после воздействия сохранялась на том же уровне, что и сразу после него, в суспензионной культуре дикого типа (Col-0) гибель клеток со временем развивалась (см. рис. 4).

Изменение экспрессии гена *AOX1a* оказывает влияние на ростовые параметры суспензионной культуры клеток, генерацию в ней АФК, содержание белка АОХ и других митохондриальных белков, вклад АОХ в дыхание и морозоустойчивость. Суспензионная культура клеток с повышенным содержанием АОХ (линия XX-2) обладает более высокой морозоустойчивостью по сравнению с культурой клеток дикого типа (Col-0) и линией со сниженным содержанием АОХ (линия AS-12). Можно предполагать, что изменения клеточного метаболизма, связанные с повышением экспрессии *AOX1a* в растительной клетке, направлены на развитие механизмов устойчивости к низкой температуре, что проявляется как в целом растении, так и в культуре клеток.

### **Заключение**

Результаты исследования показали, что суспензионные культуры клеток *A. thaliana*, полученные из семян растений со сниженной (линия AS-12) и с повышенной (линия XX-2) экспрессией гена *AOX1a*, отличаются по ряду параметров от суспензионной культуры клеток дикого типа, в том числе по содержанию АФК и жизнеспособности клеток при действии отрицательной температуры (-10 °С). Более высокое содержание белка АОХ и высокий её вклад в дыхание митохондрий у линии XX-2 позволяют не только поддерживать низкое содержание АФК в клетках суспензионной культуры, но и способствуют более эффективному развитию механизмов морозоустойчивости.

*Авторы признательны В. И. Тарасенко за предоставленные семена арабидопсиса линий AS-12 и XX-2. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.*

### **Список литературы**

Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании / О. И. Грабельных, Т. П. Побежимова, Н. С. Павловская, Н. А. Королева, О. А. Боровик, И. В. Любушкина, В. К. Войников // Биологические мембраны. 2011. Т. 28, № 4. С. 274–283.

Изучение цитотоксичности гербицидов диурона и флуородифена с использованием гетеротрофной суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* L. / А. В. Федяева, И. Ли, И. В. Любушкина, И. В. Федосеева, А. В. Сидоров, Е. Г. Рихванов // Известия

Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2019. Т. 30. С. 16–31. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.16>

Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Е. Л. Таусон, Т. П. Побежимова, А. И. Катышев, Н. С. Павловская, Н. А. Королева, И. В. Любушкина, В. Ю. Башмаков, В. Н. Попов, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Биохимия. 2014. Т. 79, вып. 6. С. 647–662.

Побежимова Т. П., Колесниченко А. В., Грабельных О. И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез. М.: НИИ Промэкспобезопасность, 2004. 98 с.

Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana fad2* and *FAD3+* cell suspensions altered in membrane lipid composition / A. R. Matos, C. Hourton-Cabassa, D. Çiçek, N. Rezé, J. D. Arrabaça, A. Zachowski, F. Moreau // Plant Cell Physiol. 2007. Vol. 48, N 6. P. 856–865. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm061>

Blokhina O. B., Fagerstedt K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems // Plant Physiol. 2010. Vol. 138. P. 447–462. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x>

Change of *AOX1a* expression, encoding mitochondrial alternative oxidase, influence on the frost-resistance of Arabidopsis plants / O. I. Grabelnych, O. A. Borovik, T. P. Pobezhimova, N. A. Koroleva, I. V. Lyubushkina, N. S. Zabanova, V. K. Voinikov // J. Stress Physiol. Biochem. 2016. Vol. 12. N. 4. P. 78–90.

Clifton R., Millar A. H., Whelan J. Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1757. P. 730–741. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.009>

Fiorani F., Umbach A. L., Siedow J. N. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis *AOX1a* transgenic plants // Plant Physiol. 2005. Vol. 139. P. 1795–1805. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070789>

Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature / J. Wang, N. Rajakulendran, S. Amirsadeghi, C. Vanlerberghe // Physiol. Plant. 2011. Vol. 142. P. 339–351. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01471.x>

Isolation and properties of mitochondria from *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures / J. Davy de Virville, I. Aaron, M.-F. Alin, F. Moreau // Plant Physiol. Biochem. 1994. Vol. 32. N 1. P. 159–166.

Maxwell D. P., Wang Y., McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. Vol. 96. P. 8271–8276. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>

Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species content in *Arabidopsis* cell culture but not in whole plants / V. I. Tarasenko, E. Y. Garnik, V. N. Shmakov, Y. M. Konstantinov // Biologia Plant. 2012. Vol. 56. P. 635–640. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0115-1>

Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic *Arabidopsis* / A. Sugie, N. Naydenov, N. Mizuno, C. Nakamura, S. Takumi // Gen. Genet. Syst. 2006. Vol. 81. P. 349–354. <https://doi.org/10.1266/ggs.81.349>

Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. 2006. Vol. 126. P. 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x>

The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress / C. Valente, P. Pasqualim, T. Jacomasso, J. B. B. Maurer, E. M. de

Souza, G. R. Martinez, M. E. M. Rocha, E. G. S. Carnieri, S. M. S. C. Cadena // *Plant Sci.* 2012. Vol. 197. P. 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.007>

The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defence systems in *Arabidopsis thaliana* leaves / C. K. Watanabe, T. Hachiya, I. Terashima, K. Noguchi // *Plant, Cell and Environment.* 2008. Vol. 31. P. 1190–1202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01834.x>

The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots / J. Borecky, F. T. S. Nogueira, K. A. P. de Oliveira, I. G. Maia, A. E. Vercesi, P. Arruda // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. P. 849–864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj070>

Umbach A. L., Fiorani F., Siedow J. N. Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139. P. 1806–1820. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070763>

Vanlerberghe G. C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // *Int. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 6805–6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>

## Characterization of Suspension Cultures of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Cells with Altered Expression of the Gene of Alternative Mitochondrial Oxidase *Aox1a* and Analysis of their Frost Resistance

A. V. Stepanov<sup>1</sup>, S. A. Kashin<sup>2</sup>, N. S. Zabanova<sup>1,2</sup>, O. A. Fedotova<sup>1</sup>,  
A. V. Fedyaeva<sup>1</sup>, I. V. Lyubushkina<sup>1,2</sup>, T. P. Pobezhimova<sup>1</sup>,  
O. I. Grabelnych<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*

**Abstract.** The enzyme alternative cyanide-resistant oxidase (AOX) localized in mitochondria is involved in the processes of plant adaptation to various unfavorable biotic and abiotic factors. Transfer of electrons from ubiquinone to oxygen by alternative oxidase has a non-protonmotive character and, by bypassing two sites of H<sup>+</sup> pumping in complexes III and IV, lowers the energy efficiency of respiration and energy of electron flow through AOX is released as heat. In this work, we characterized heterotrophic suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh cells obtained from seeds of plants with altered (AS-12 line) and increased (XX-2 line) expression of the alternative oxidase gene *AOX1a* and studied their viability under subzero temperature (-10 °C for 3, 6, 9 hours). Cell viability and reactive oxygen species (ROS) production were assessed using fluorescence microscopy with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for cell viability measurement and H<sub>2</sub>DCF-DA for ROS measurement. The proportion of living cells was calculated as the proportion of FDA-positive and PI-negative cells. Differences between the studied lines were determined in the content of mitochondrial proteins of the respiratory chain (AOX, COXII, NDB) and uncoupling protein (UCP), as well as in the intensity of formation of ROS and frost resistance. The obtained results confirmed the higher content of the AOX protein and its high contribution to mitochondrial respiration in line XX-2. Suspension culture cells of the AS-12 line showed a decrease in the AOX protein content and its contribution to mitochondrial respiration, compared to the wild type (Col-0) and line XX-2. Simultaneously with a decrease in the AOX protein content in the AS-12 cell culture, an increase in the content of the uncoupling protein UCP

and subunit II of cytochrome oxidase (COXII) was observed. ROS generation was reduced in cell cultures of both XX-2 and AS-12. The obtained results indicate that the cells of the wild-type (Col-0) suspension culture were subjected to the most significant effect of subzero temperature. Long-term exposure (for 9 h) under  $-10^{\circ}\text{C}$  revealed significant differences in the viability of wild-type culture cells and lines with altered *AOX1a* gene expression. Cells of line XX-2 with an increased content of AOX turned out to be more resistant to subzero temperature compared to wild-type and AS-12 cells. However, while the proportion of living cells in the culture of the AS-12 line 48 h after exposure remained at the same level as immediately after it, in the suspension culture of the wild type cell death developed over time. The obtained results indicate the importance of alternative oxidase in the development of frost resistance in plant cell.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, suspension cultures of cells, respiration, alternative oxidase, *AOX1a*, reactive oxygen species.

**For citation:** Stepanov A.V., Kashin S.A., Zabanova N.S., Fedotova O.A., Fedyayeva A.V., Lyubushkina I.V., Pobezhimova T.P., Grabelnykh O.I. Characterization of Suspension Cultures of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Cells with Altered Expression of the Gene of Alternative Mitochondrial Oxidase *Aox1a* and Analysis of their Frost Resistance. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2021, vol. 35, pp. 3-18. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.35.3> (in Russian)

## References

Grabelnykh O.I., Pobezhimova T.P., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Borovik O.A., Ljubushkina I.V., Vojnikov V.K. Antioksidantnaya funkciya alternativnoy oksidazy v mitohondriyah ozimoy pshenitsy pri holodovom zakalivanii [Antioxidant function of alternative oxidase in winter wheat mitochondria during cold hardening]. *Biologicheskie membrany* [Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology], 2011, vol. 28, pp. 274-283. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1990747811040040>

Fedyayeva A.V., Li I., Lyubushkina I.V., Fedoseeva I.V., Sidorov A.V., Rikhvanov E.G. Izuchenie tsitotoksichnosti gerbitsidov diurona i fluorodifena s ispolzovaniem geterotrofnoi suspenzionnoi kul'tury kletok *Arabidopsis thaliana* L. [Study of the cytotoxicity of the herbicides of diuron and fluorodifen using a heterotrophic suspension cell culture of *Arabidopsis thaliana* L.]. *The Bull. Irkutsk St. Univ. Ser. Biol. Ecol.*, 2019, vol. 30, pp. 16-31. (in Russian). <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2019.30.16>

Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhimova T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Bashmakov V.Yu., Popov V.N., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Mitokhondrialnye energorasseivayushchie sistemy (al'ternativnaya oksidaza, razobshchayushchie belki i "vneshnyaya" NADH-degidrogenaza) вовлечены в развитие морозостойчивости проростков озимой пшеницы [Mitochondrial energy dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings]. *Biochemistry (Mosc.)*, 2014, vol. 79, pp. 506-519. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297914060030>

Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabelnykh O.I. Metody izuchenija mitohondriy rastenij. Poljarografiya i jelektroforez [Methods for studying plant mitochondria. Polarography and electrophoresis]. Moscow, Promjekspobezopasnost Publ., 2004, 98 p. (in Russian).

Matos A.R., Hourton-Cabassa C., Çiçek D., Rezé N., Arrabaça J. D., Zachowski A., Moreau F. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana* fad2 and FAD3+ cell suspensions altered in membrane lipid composition. *Plant Cell Physiol.*, 2007, vol. 48, no. 6, pp. 856-865. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm061>

Blokhina O.B., Fagerstedt K.V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Plant Physiol.*, 2010, vol. 138, pp. 447-462. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x>

Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Pobezhimova T.P., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Zabanova N.S., Voinikov V.K. Change of *AOX1a* expression, encoding mitochondrial alterna-

tive oxidase, influence on the frost-resistance of Arabidopsis plants. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 2016, vol. 12, no. 4, pp. 78-90. (in Russian)

Clifton R., Millar A.H., Whelan J. Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1757, pp. 730-741. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.009>

Fiorani F., Umbach A.L., Siedow J.N. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis AOX1a transgenic plants. *Plant Physiol.*, 2005, vol. 139, pp. 1795-1805. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070789>

Wang J., Rajakulendran N., Amirsadeghi S., Vanlerberghe C. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiol. Plant.*, 2011, vol. 142, pp. 339-351. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01471.x>

Davy de Virville J., Aaron I., Alin M.-F., Moreau F. Isolation and properties of mitochondria from *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.*, 1994, vol. 32, no. 1, pp. 159-166.

Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, vol. 96, pp. 8271-8276. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>

Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species content in Arabidopsis cell culture but not in whole plants. *Biologia Plant.*, 2012, vol. 56, no. 4, pp. 635-640. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0115-1>

Sugie A., Naydenov N., Mizuno N., Nakamura C., Takumi S. Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic Arabidopsis. *Gen. Genet. Syst.*, 2006, vol. 81, pp. 349-354. <https://doi.org/10.1266/ggs.81.349>

Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.*, 2006, vol. 126, pp. 45-51. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x>

Valente C., Pasqualim P., Jacomasso T., Maurer J.B.B., de Souza E.M., Martinez G.R., Rocha M.E.M., Carnieri E.G.S., Cadena S.M.S.C. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. *Plant Sci.*, 2012, vol. 197, pp. 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.007>

Watanabe C.K., Hachiya T., Terashima I., Noguchi K. The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defence systems in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment*, 2008, vol. 31, pp. 1190-1202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01834.x>

Borecky J., Nogueira F.T.S., de Oliveira K.A.P., Maia I.G., Vercesi A.E., Arruda P. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, pp. 849-864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj070>

Umbach A.L., Fiorani F., Siedow J.N. Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol.*, 2005, vol. 139, pp. 1806-1820. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070763>

Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, pp. 6805-6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>

*Степанов Алексей Владимирович*  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: saw33@list.ru

*Stepanov Aleksey Vladimirovich*  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: saw33@list.ru

*Кашин Сергей Александрович*  
магистрант  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: sergeikashin1996@mail.ru

*Kashin Sergei Aleksandrovich*  
Undergraduate  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: sergeikashin1996@mail.ru

*Забанова Наталья Сергеевна*  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: pavnatser@mail.ru

*Zabanova Natalya Sergeevna*  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Assistant Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: pavnatser@mail.ru

*Федотова Ольга Андреевна*  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: ol.borovik@mail.ru

*Fedotova Olga Andreevna*  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: ol.borovik@mail.ru

*Федяева Анна Валерьевна*  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

*Fedyaeva Anna Valeryevna*  
Candidate of Science (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

*Любушкина Ирина Викторовна*  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН

*Lyubushkina Irina Viktorovna*  
Candidate of Science (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS

*Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru*

*Побежимова Тамара Павловна  
доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru*

*Грабельных Ольга Ивановна  
доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
профессор  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. К. Маркса, 1  
e-mail: grolga@sifibr.irk.ru*

*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Assistant Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru*

*Pobezhimova Tamara Pavlovna  
Doctor of Sciences (Biology),  
Principal Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: pobezhimova@sifibr.irk.ru*

*Grabelnykh Olga Ivanovna  
Doctor of Sciences (Biology),  
Principal Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: grolga@sifibr.irk.ru*

**Дата поступления:** 24.09.2020  
**Received:** September, 24, 2020