

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА
NDB2 Arabidopsis thaliana НА РОСТ
И ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ *Nicotiana tabacum*¹

© 2023 г. Н. Е. Коротаева^{a, *}, А. М. Шигарова^a, А. И. Катъшев^a, И. В. Федосеева^a,
А. В. Федяева^{a, b}, Д. В. Савчин^c, А. М. Шишлова-Соколовская^c,
О. Ю. Урбанович^c, Г. Б. Боровский^a

^a Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

^b Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

^c Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: knev73@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.01.2023 г.

После доработки 14.03.2023 г.

Принята к публикации 16.03.2023 г.

С помощью агробактериальной трансформации и последующего отбора получены линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) с высокой экспрессией гена *AtNDB2* (*NDB2* из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Типичная по внешнему виду и величине экспрессии *AtNDB2* линия 13s была исследована по ростовым показателям и параметрам дыхательной активности при оптимальной и субоптимальной температурах в сравнении с исходной разновидностью *N. tabacum*. Результаты показали, что в условиях субоптимальной температуры в растениях линии 13s наблюдалось усиление общего и альтернативного дыхания и снижение генерации супероксидного аниона. Скорость роста у растений с усиленной экспрессией *AtNDB2* по сравнению с контрольными была снижена, особенно при температуре ниже температурного оптимума. Обсуждаются возможные причины таких изменений.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *AtNDB2*, АФК, агробактериальная трансформация, активность дыхания, скорость роста

DOI: 10.31857/S0015330323600031, **EDN:** PBSFBL

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что повышению защитных свойств растений по отношению к неблагоприятным факторам внешней среды способствует умеренное увеличение концентрации эндогенных АФК в растительной ткани, которые являются сигнальными молекулами для запуска ряда защитных механизмов. В нестрессовых условиях АФК образуются в клетке на низких уровнях в результате утечки электронов во время фотосинтеза, дыхания и фотодыхания [1]. В ответ на эндогенные сигналы (гормоны и сигнальные молекулы), а также стимулы окружающей среды (биотические или абиотические стрессы) индуцируется несколько ферментов, продуцирующих АФК, таких как: NAD(P)H-окси-

дазы, аминоксидазы, полиаминоксидазы, оксалаксидазы и большое семейство пероксидаз класса III [2, 3]. Считается, что в клетках растений среди ферментов, продуцирующих АФК, основное участие принимают NAD(P)H-оксидазы [4, 5]. В растительных клетках большая часть вырабатываемых АФК происходит из хлоропластов или пероксисом, но в незеленых тканях или в темноте продукция АФК в митохондриях становится преобладающей [6, 7]. Митохондрии являются одной из главных мишеней окислительного повреждения при стрессе [8], с другой стороны, они остаются одним из наиболее важных источников АФК [9, 10]. В изолированных митохондриях клеток растений и животных основными сайтами генерации АФК являются комплексы I и III дыхательной цепи [11].

При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи, который является одной из точек генерации мембранного потенциала. У большин-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600031 для авторизованных пользователей.

Сокращения: АОХ — альтернативная оксидаза; БГК — бензгидроксамовая кислота; НФП — нефосфорилирующий путь.

ства организмов его работа ингибируется ротеноном. Часть организмов, в том числе растения, грибы и некоторые микроорганизмы, имеют дыхание, не чувствительное к ротенону. NADH или NADPH при этом окисляется несколькими ферментами, локализованными на наружной или на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны. У *Arabidopsis thaliana* найдены три группы генов, кодирующих такие NAD(P)H-дегидрогеназы второго типа (NDII): *NDA* (два гена), *NDB* (четыре гена), и *NDC* (один ген) [12]. Установлена локализация данных ферментов: NDB1–NDB4 являются внешними (расположены на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий), а NDA1–NDA2 и NDC1 – внутренними (обращены к митохондриальному матриксу) [13]. Точные физиологические функции конкретных белков семейства NDII не определены. Наиболее распространенной точкой зрения является их вовлеченность (вместе с альтернативной оксидазой – АОХ) в формирование нефосфорилирующей дыхательной цепи (или нефосфорилирующего пути, НФП) при окислительном стрессе и метаболическом дисбалансе [14]. С этими представлениями согласуются и наши данные о том, что в прорастающих семенах сохраняется способность митохондрий к окислению экзогенного NADH при действии отрицательной температуры, и именно окисление внешнего NADH, главным образом, обеспечивает энергетический метаболизм при низких температурах у растений [15]. Однако в вопросе о связи активности NDII и уровня генерации АФК много неясного. Поскольку альтернативные NAD(P)H дегидрогеназы растений содержат в качестве кофактора ФАД, исследователи не исключают, что они могут быть потенциальными сайтами генерации АФК у растений [9].

Перекликающиеся с этим данные были получены нами: митохондриальный мембранный потенциал и уровень генерации АФК существенно подавлялись добавлением к клеткам *Saccharomyces cerevisiae* DPI (дифенилениодоний, ингибитор внешних и внутренних NADH-дегидрогеназ), а также у дрожжей с делецией гена *NDE1*, кодирующего наружную NAD(P)H-дегидрогеназу. Следовательно, NAD(P)H-дегидрогеназы – это важный источник АФК [16]. С помощью изолированных митохондрий *S. cerevisiae* показано, что внешние NADH-дегидрогеназы являются основными источниками генерации АФК при использовании NADH в качестве субстрата [17]. Аналогичная ситуация наблюдалась в клетках гриба *Neurospora crassa*. Делеция генов *NDE1* и *NDE2*, кодирующих внешние альтернативные NADH-дегидрогеназы, снижала продукцию АФК при обработке прооксидантом паракватом [18]. Таким образом, несмотря на то, что существует много аргументов за то, что ферменты NDII участвуют в снижении ге-

нерации АФК, активность этих дегидрогеназ служит в ряде случаев источником АФК.

У растений полностью блокировать синтез всех NDII не удастся, поскольку при этом невозможно получить жизнеспособные семена [19], однако опубликовано несколько работ по растениям *A. thaliana* со сниженной экспрессией отдельных генов NDII. Исследователи [20, 21] изучали, как подавление экспрессии генов *NDA1*, *NDA2*, а также *NDB1*, кодирующих альтернативные внутренние и внешние NAD(P)H дегидрогеназы *A. thaliana*, влияет на рост и метаболизм растений, а также на изменение экспрессии других генов. Показано, что снижение количества белков *NDA1* и *NDA2* приводит к замедлению роста и повышению уровня лактата. Увеличение интенсивности света активировало экспрессию гена альтернативной оксидазы (*AOX1a*), повышало активность АОХ и цитохром с оксидазы, а также уровень метаболитов цикла Кребса. Однако существенных фенотипических различий между мутантами и родительским типом не было выявлено [20]. Снижение количества белка *NDB1* нарушало рост растений, но не влияло на дыхательную активность. В то же время, недостаток *NDB1* значительно влиял на экспрессию генов, участвующих в белковом синтезе, а также в функционировании сигнальных систем растений [21]. К сожалению, уровень генерации АФК в этих экспериментах не определяли.

Существуют результаты, показывающие, что частичное подавление экспрессии гена *NDB4*, кодирующего внешнюю NADH-дегидрогеназу *A. thaliana*, приводило к снижению уровня генерации АФК. Авторы полагают, что данный эффект обуславливается повышением активности антиоксидантных ферментов и альтернативной оксидазы [19]. Долгое время неисследованным с использованием нокаут мутантов оставался белок *NDB2*. Между тем этот белок, возможно, имеет наибольшее отношение к устойчивости растений к стрессам. На такую возможность кроме физиологических исследований, о которых было написано выше, указывают эксперименты с растениями *A. thaliana*, у которых с помощью RNAi был уменьшен синтез *NDB4*. Такие растения, вероятно, вследствие компенсаторного эффекта, значительно увеличили синтез *NDB2* и АОХ, что привело к уменьшению образования АФК клетками, увеличению солеустойчивости, а также некоторым изменениям в скорости роста и фенотипе растений [19]. С использованием озимой пшеницы также было показано, что повышение способности АОХ к транспорту электронов после действия на проростки закалывающей отрицательной температуры связано с сохранением высокой активности *NDB2*, которая, вероятно, играет важную роль в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при действии отрицательных температур [22]. Наконец,

в 2019 г. появилась работа Sweetman с соавт. [14], в которой был показан рост устойчивости *A. thaliana* к засухе при одновременной гиперэкспрессии *AtAOX1a* и *AtNDB2*, в то же время гиперэкспрессор одного гена *NDB2* не демонстрировал фенотипических отличий от дикого типа и повышенной устойчивости к засухе.

Субоптимальные температуры для теплолюбивых растений являются более физиологичными, поскольку их воздействию растения в естественных условиях подвержены значительно более длительное время вегетации, чем действию более низких температур [23]. Субоптимальные температуры, в отличие от холодового стресса, замедляют, но не останавливают рост и метаболизм растений [23, 24]. При этом защитные механизмы, подготавливающие растения к воздействию более низких температур, активируются при субоптимальном температурном воздействии, в том числе у табака [25]. По нашим представлениям, повышенная активность *NDB2* должна изменять в растениях потенциал на внутренней митохондриальной мембране и уровень генерации АФК как при стрессе, так и в нормальных условиях. Изменение уровня АФК, в свою очередь может влиять на реакцию растений на температуру внешней среды. Таким образом, целью нашей работы было определение роли альтернативных путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий растений при неблагоприятных условиях. Задачей исследования являлась характеристика растений табака с гиперэкспрессией гетерологичного гена *NDB2 A. thaliana* в нормальных условиях выращивания и в условиях воздействия субоптимальной температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника для клонирования нативного гена *AtNDB2* использованы растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Columbia). В экспериментах по трансформации использована линия табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1. Выделение РНК и синтез кДНК выполняли с помощью наборов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit и RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). Для последующего клонирования амплифицировали с помощью ПЦР с использованием Pfu-полимеразы и синтетических олигонуклеотидов NDB2-F и NDB2-R (табл. 1 Дополнительные материалы) последовательность кДНК гена *NDB2 A. thaliana*, соответствующую транслируемой области мРНК.

При создании векторных конструкций использовали методики ПЦР, рестрикции и лигирования фрагментов ДНК, основанные на стандартных протоколах [26]. Векторная конструкция для трансформации растений получена на основе бинарного вектора pBI121 [27]. Предварительно в

данный вектор были введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I, что позволяло клонировать целевой ген между конститутивным промотором 35S РНК CaMV и терминатором нопаин-синтазы (*NOS*). Корректность сборки векторных конструкций подтверждали методом NGS-секвенирования на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США), используя набор Nextera XT DNA (Illumina, США). Анализ данных NGS выполняли с помощью программ FastQC, Trimmomatic, SPAdes, UGENE, Vector NTI. Для введения гетерологичного гена *AtNDB2* применяли *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию листовых дисков 3–4-недельных растений табака, выращенных при температуре 24°C, освещенности 140 мкмоль/(м² с), 16/8 ч (свет/темнота) фотопериоде.

Для инициации процессов морфогенеза и отбора первичных трансформантов использовали питательные среды CIM, SIM и RIM [28] с селективным агентом канамицином в концентрации 50 мг/л. Выделение растительной ДНК выполняли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). Тотальную РНК выделяли с помощью набора реагентов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) по методике изготовителя. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью набора реагентов First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) по методике изготовителя. Анализ регенерантов производили методами ПЦР и ПЦР-РВ, используя синтетические олигонуклеотиды, представленные в таблице 1 Дополнительных материалов. ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), используя набор реактивов qPCR mix-HS SYBR (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Анализ данных ПЦР-РВ проводили с помощью программного обеспечения SFX Manager (Bio-Rad, Германия). В качестве референсных генов в количественной ПЦР использовали гены *EF-1α* и *NTUBc2* [29]. В результате размножения и отбора на селективной среде получено продуктивное поколение регенерантов табака T4, не проявляющее расщепления в следующем поколении, выживающее на селективной среде с канамицином и демонстрирующее стабильную экспрессию гена *NDB2 A. thaliana*. Поколение T5 выращивали в ростовых климатических камерах (Binder, Германия) при освещении 140 мкмоль/(м² с), фотопериоде 16/8 (день/ночь) и температуре 25/20°C, соответственно, с ежемесячным внесением комплексного минерального удобрения “Акварин для цветов” (ОАО “Буйский химический завод”) в концентрации 1 г/л до момента сбора семян. Типичная по своим свойствам линия 13s, несущая ген *NDB2 A. thaliana*, была выбрана в качестве экспериментальной для дальнейшего исследова-

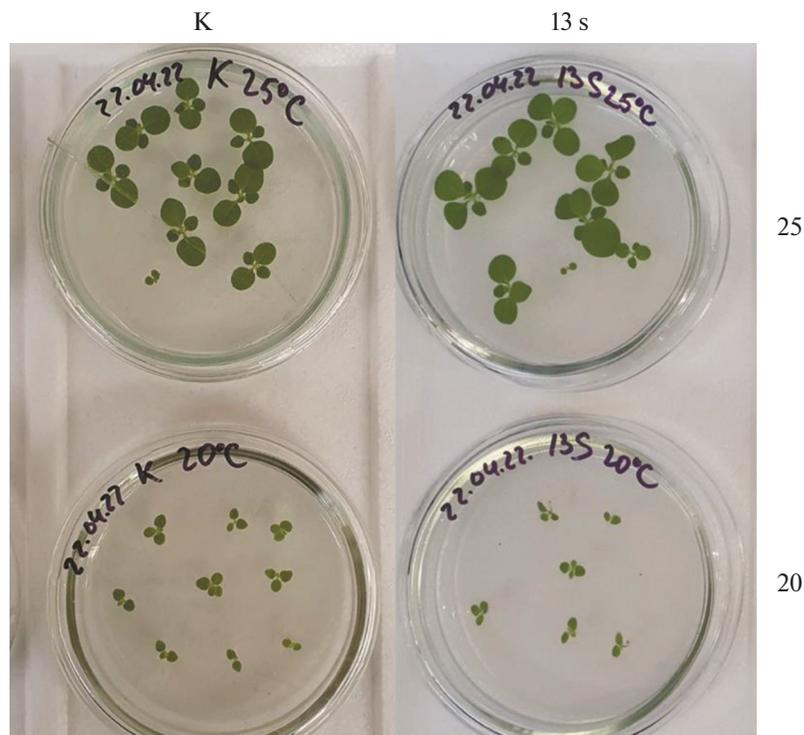


Рис. 1. Трансформированные растения табака и растения дикого типа через 21 сутки после начала роста на агаризованной питательной среде. 13s – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; K – дикий тип; 20 – выращивание при 20°C; 25 – выращивание при 25°C. Диаметр чашки Петри равен 10 см.

ния. В качестве контроля использовали нетрансформированные растения табака.

Семена табака, полученные от растений дикого типа и растений линии 13s, стерилизовали в ламинарном боксе в 0.05% растворе Tween 20 (2 мин), 0.04% растворе гипохлорита натрия (4 мин) и 96% этаноле (5 с), периодически встряхивая и промывая после каждого стерилизующего раствора 5-6 раз в дистиллированной воде. После стерилизации семена раскладывали в чашки Петри на агаризованную питательную среду, содержащую $\frac{1}{2}$ солей по Murashige и Skoog [30] с добавлением 360 мг/л сахарозы, 0.6 мг/л тиамина, 0.3 мг/л пиридоксина, 0.3 мг/л никотиновой кислоты, 0.6 мг/л инозита. После этого чашки Петри помещали в ростовые камеры MKT-240 (Binder, Германия) при освещении 140 мкмоль/(м² с), фотопериоде 16/8 (день/ночь) и температуре 20°C или 25°C. Начиная с 8 сут растения фотографировали и производили подсчет суммарной площади листовых пластинок в программе ImageJ, для этого использовали фотографии растений на 8, 10, 14, 18 и 20 сут.

Оценку накопления белкового продукта гена гиперэкспрессора *NDB2* проводили с помощью электрофореза и Western blot в системе Bio-Rad. Для выделения общего белка использовали 0.5 г листьев 2-месячных растений. Листья замораживали в жидком азоте и растирали с кварцевым песком в 2.5 мл буфера, содержащего 100 мМ

Трис-НСl (рН 7.4), 0.1% ДДС, 12 мМ β-меркаптоэтанол, 0.5 мМ фенолметилсульфонилфлюорид и 50 мг нерастворимого поливинилпирролидона. После центрифугирования (18000 g, 10 мин) белок из супернатанта осаждали пятикратным объемом охлажденного до –20°C ацетона (8500 g, 10 мин). Полученный осадок растворяли в буфере для образца и определяли содержание белка в получившихся пробах с реактивом Брэдфорд (Bio-Rad, США). По 30 мкг белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в 12% ПААГ в присутствии ДДС и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в системе miniProtean III (Bio-Rad, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для идентификации белка *NDB2* использовали первичные антитела против *NDB2* (PHY1403A, PhytoAB, США) и вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Визуализацию антител проводили с использованием хромогенов BCIP (5-bromo-6-chloro-3-indolylphosphate-p-toluidine salt, Gerbu, Германия) и NBT (nitrotetrazolium blue chloride, AppliChem, Германия).

Оценку дыхательной активности и показателей окислительного стресса проводили на 21-дневных растениях, выращенных при 25°C, и 28-дневных растениях, выращенных при 20°C (рис. 1). Растения разного возраста использовали, чтобы уменьшить у опытных образцов разницу в размере сум-

марной площади листовых пластинок. Чтобы охарактеризовать дыхание, проводили измерение скорости поглощения кислорода измельченными листьями при 20°C или 25°C, соответственно температуре выращивания растений. Скорость поглощения кислорода определяли полярографически с использованием электрода Кларка и системы Oxytherm (Hansatech Instruments, Англия). Для измерения общей скорости поглощения кислорода клетками 50 мг листьев инфильтровали буфером Tris-HCl (100 мМ, pH 7.5), далее листья измельчали лезвием на отрезки не более 1 мм шириной и помещали в ячейку объемом 1.4 мл, содержащую насыщенный кислородом буфер Tris-HCl (100 мМ, pH 7.5). Сначала измеряли скорость поглощения кислорода без ингибиторов. Для оценки скорости цианид-устойчивого дыхания, связанного с активностью альтернативной оксидазы, в ячейку последовательно добавляли KCN (ингибитор цитохром с-оксидазы митохондрий) до конечной концентрации 1.2 мМ и бензгидроксамовую кислоту (БГК, ингибитор альтернативной оксидазы митохондрий) до конечной концентрации 6 мМ. Оптимальную концентрацию ингибиторов подбирали титрованием с возрастающей концентрацией до такой, после которой дальнейшее увеличение концентрации уже не влияет на скорость поглощения O₂. Дыхание после добавления этих ингибиторов считали остаточным (немитохондриальным). Концентрацию ингибиторов и длительность инкубации подбирали в предварительном эксперименте. Скорость дыхания рассчитывали относительно сырого веса листьев и выражали в нмоль поглощенного O₂/(мин г сырой массы).

Скорость поглощения кислорода растительным материалом в буферном растворе, не содержащем ингибиторов, была принята за общее дыхание ($V_{\text{общ}}$); в буферном растворе, содержащем KCN — за цианид-резистентное или альтернативное дыхание ($V_{\text{альт}}$); в буферном растворе, содержащем KCN и БГК — за остаточное дыхание ($V_{\text{ост}}$). Кроме того, вычисляли скорость поглощения кислорода в процентах от общего дыхания.

Процент цитохромного пути дыхания (%ЦП) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ЦП} = \left(\frac{V_{\text{общ}} - V_{\text{альт}}}{V_{\text{общ}}} \right) \times 100.$$

Процент альтернативного пути дыхания (%АП) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{АП} = \left(\frac{V_{\text{альт}} - V_{\text{ост}}}{V_{\text{общ}}} \right) \times 100.$$

Процент остаточного дыхания (%ОД) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ОД} = 100 - (\% \text{ЦП} + \% \text{АП}).$$

Для выявления развития окислительного стресса в листьях растений оценивали уровень генерации супероксидного аниона. Для этого использовали метод окрашивания с помощью NBT (AppliChem, Германия), основанный на образовании в присутствии супероксидного аниона формазана с последующей экстракцией и определением его содержания колориметрически на приборе SmartSpec Plus (BioRad, США) [31]. Итоговое значение содержания формазана было получено с поправкой на сырую массу образца.

Каждое измерение проводили не менее чем в трех биологических повторностях. Для статистической обработки данных использовали программы Statistica и SigmaPlot. Вычисляли среднее значение и доверительный интервал ($P = 0.05$). Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения трансгенных растений табака транслируемую последовательность кДНК гена *NDB2* (AT4G05020) *A. thaliana* размером 1749 п.н. клонировали по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I в составе бинарной плазмиды pBI121, в которую предварительно был введен сайт узнавания *Kpn*I. Для повышения эффективности экспрессии целевого гена важно наличие нуклеотида А в положении -3 и нуклеотида G в положении $+4$ [32]. Для соответствия этим критериям проведена модификация 5'-концевого участка последовательности нативного гена *AtNDB2* — добавлена последовательность Козак ААСА перед стартовым кодоном. Также после стартового кодона был добавлен кодон GGT, кодирующий стабилизирующую аминокислоту валин. Стоп-кодон TGA был заменен на более предпочтительный для растений TAA. Созданный вектор получил название pBI121_NDB2 (рис. 2). С помощью секвенирования было показано полное соответствие целевой нуклеотидной последовательности векторной конструкции и референсной последовательности гена *A. thaliana* и отсутствие замен нуклеотидов в ней.

В результате эксперимента по агробактериальной трансформации растений табака вектором pBI121_NDB2 из каллусной культуры было получено 57 регенерантов. При достижении размера 2–3 см регенеранты срезали с каллуса и перенесли на среды с селективным агентом для укоренения. В процессе культивирования 28 регенерантов (49.1% от общего количества полученных регенерантов) образовывали корни и развивались на средах с селективным агентом канамицином.

Для подтверждения интеграции в геном трансформированных растений табака последовательности целевого гена под контролем промотора

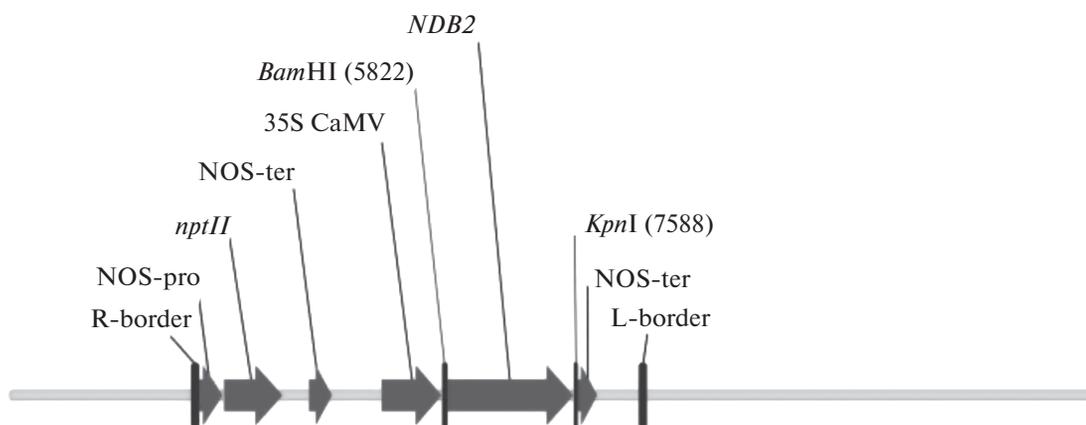


Рис. 2. Схема векторной конструкции pBI121_NDB2: R-border, L-border – правый и левый концевые повторы области T-ДНК; NOS-pro – промотор нопалин-синтазы; *nptII* – селективный ген неомицинфосфотрансферазы II типа, определяющей устойчивость к канамицину; NOS-ter – терминатор нопалин-синтазы; 35S CaMV – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; *NDB2* – ген “внешней” нефосфорилирующей НАД-Н дегидрогеназы; *Bam*HI, *Kpn*I – сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции.

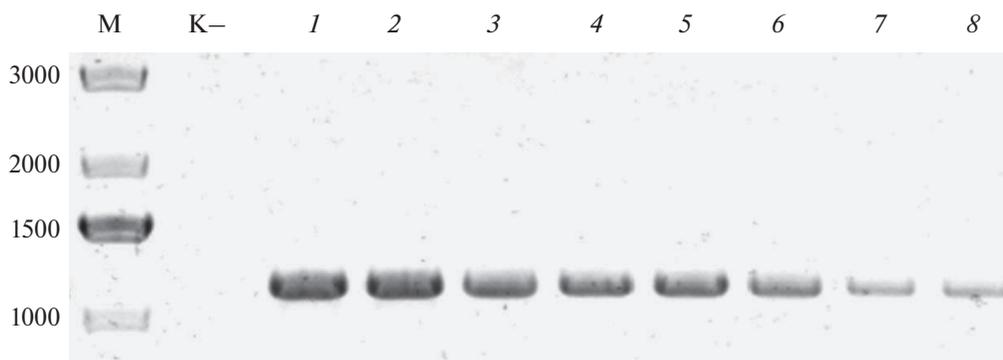


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продукта, выявленного при амплификации ДНК регенерантов табака со вставкой гена *NDB2 A. thaliana*. М – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); К– – нетрансформированные растения табака; 1 – плазмида pBI121_NDB2; 2 – 8 – анализируемые трансгенные линии.

35S РНК CaMV провели ПЦР-анализ с олигонуклеотидами 35SEF и Ndb2gR (Дополнительные материалы, табл. 1). Амплификация фрагмента размером около 1300 п.н. подтвердила наличие анализируемой вставки ДНК в геноме трансгенных растений табака (рис. 3).

Экспрессию целевого гена в трансформированных растениях исследовали как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Анализ с помощью ПЦР-РВ экспрессии гетерологичного гена *NDB2 A. thaliana* в трансформированных Т4-растениях табака типичной линии 13s показал высокий уровень экспрессии трансгена – примерно в 34 раза ($\log_2 = 5.1$) выше экспрессии собственного гена *NDB2* табака (рис. 4а).

Согласно данным Western blot, в общих белковых экстрактах из листьев табака собственный белок *NDB2* в контрольных и трансгенных растениях не детектировался, выявлялся только продукт

введенного гена арабидопсиса в трансформированных растениях (рис. 4б). Эти данные подтверждают, что в полученных трансгенных растениях экспрессия гетерологичного гена существенно выше экспрессии собственного гена *NDB2* табака.

Сравнительная оценка скорости роста показала, что, судя по изменению площади листовой пластинки, трансформированные растения уступают в темпах роста растениям дикого типа при выращивании при 20°C на 14, 18 и 21 сут и при выращивании при 25°C на 21 сут (рис. 5). На скорость роста также влияла температура выращивания: начиная с 14 сут у выращенных при 20°C растений площадь листовой пластинки была меньше, чем у растений, выращенных при 25°C. Такой эффект наблюдался как у растений дикого типа, так и у линии 13s.

Оценка скорости поглощения кислорода показала некоторые различия в скорости дыхания

между опытными растениями (рис. 6). Значимые различия были выявлены в скорости альтернативного дыхания ($V_{\text{альт}}$) между растениями дикого типа и трансформантами, выращенными при 20°C (рис. 6а), при этом $V_{\text{альт}}$ оказалась выше у растений линии 13s. Скорость общего дыхания у 13s растений была достоверно выше при выращивании при 20°C (рис. 6а). Значимых различий не обнаружено в скорости дыхания в отсутствие ингибиторов и в скорости цитохромного и остаточного дыхания и вкладов цитохромного и альтернативного дыхания (рис. 6б).

Между растениями дикого типа и трансформантами не обнаружено различий в уровне генерации супероксидного аниона в листьях (рис. 7). Также оно было одинаковым у трансформированных растений, выращенных при разной температуре. Однако, по сравнению с растениями, выращенными при 25°C, у растений дикого типа, выращенных при 20°C, уровень генерации супероксидного аниона оказался выше, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения табака с повышенной экспрессией гетерологичного гена *NDB2 A. thaliana*, характеризующиеся как высоким содержанием транскрипта, так и белкового продукта целевого гена, чего, согласно литературным данным, не всегда удается добиться [33]. Базовый уровень экспрессии собственного гена *NDB2* табака был низким, вследствие чего белковый продукт этого гена в экстрактах листьев не детектировался, в отличие от продукта трансгена (рис. 4).

Наблюдались фенотипические различия между трансформированными и контрольными растениями, выражающиеся в различной скорости роста (рис. 5): у растений табака с гиперэкспрессией *NDB2 A. thaliana* скорость роста была ниже, чем у нетрансформированных растений. Особенно ярко такие различия проявились при выращивании растений в условиях субоптимальной температуры 20°C. Трансформанты отставали в скорости роста в нормальных условиях на 21 сут, а при 20°C – начиная с 14 сут (рис. 5). Наблюдаемое торможение ростовых процессов в растениях табака при действии субоптимальной температуры – один из характерных признаков стрессовой реакции и, скорее всего, относится к адаптивной реакции в ответ на снижение температуры. В пользу такого предположения свидетельствуют данные Yang с соавт. [25] показавших, что у растений табака в результате длительного воздействия субоптимальной температуры повышается содержание растворимых клеточных белков и снижается степень повреждения клеточ-

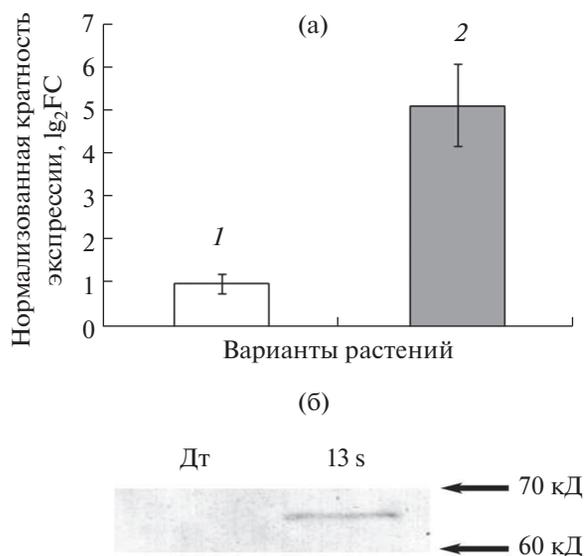


Рис. 4. Содержание мРНК гена *NDB2 A. thaliana* и белка *NDB2* в листьях табака. (а) – сравнительный анализ количества мРНК гена *NDB2* арабидопсиса в трансгенных растениях табака линии 13s. 1 – контрольные растения, 2 – трансгенные растения. Приведены средние значения и стандартные отклонения ($n = 14$); (б) – содержание *NDB2* в листьях табака по результатам Western blot. 13s – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; Дт – дикий тип. Справа приведены значения молекулярных масс маркерных белков.

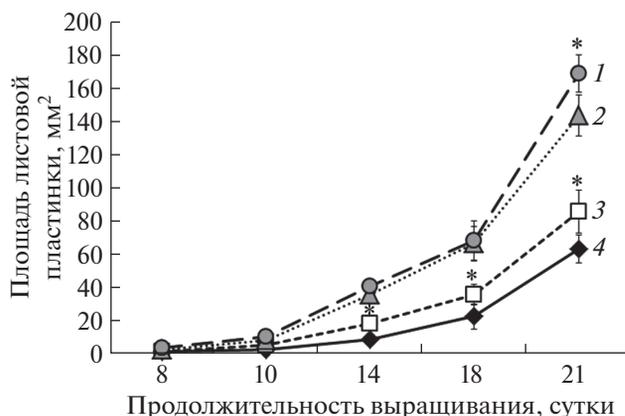


Рис. 5. Изменение площади листовой пластинки у растений табака дикого типа и трансформантов на разные сутки от начала выращивания. 1, 3 – дикий тип; 2, 4 – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; 1, 2 – выращивание при 25°C; 3, 4 – выращивание при 20°C. Площадь листьев (мм²) измеряли с помощью программы ImageJ. Приведены средние значения и доверительные интервалы ($P < 0.05$, $n = 3$). * – различия статистически значимы при $P < 0.05$. Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica.

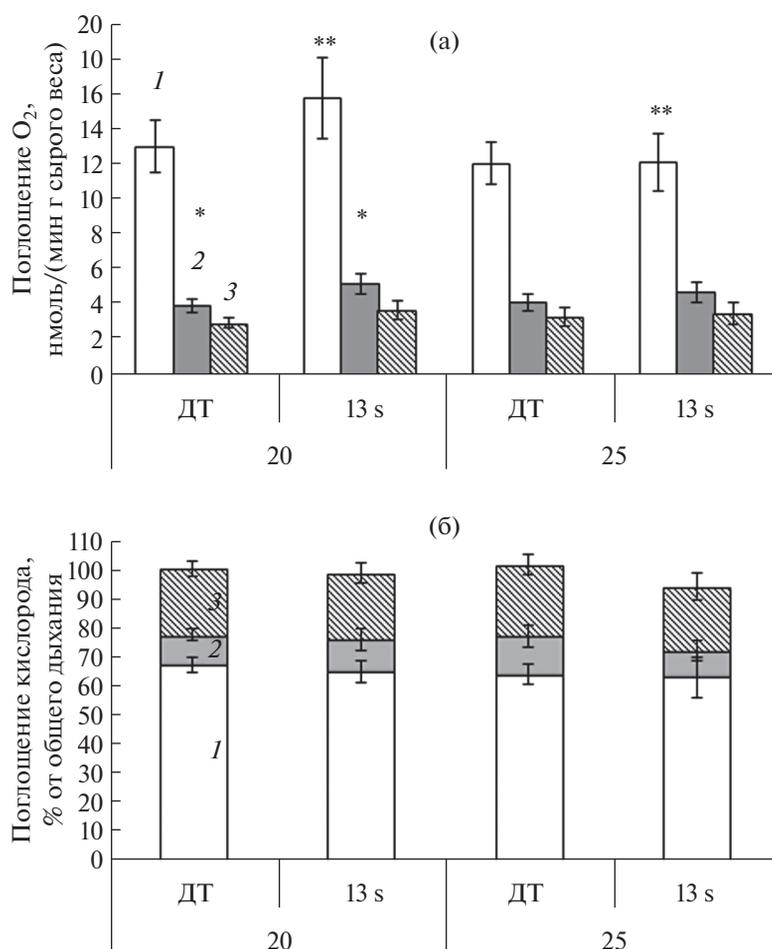


Рис. 6. Влияние температуры выращивания на дыхательную активность листьев табака. (а) – скорость дыхания, выраженная в нмоль поглощения кислорода. Показана величина поглощения O_2 в ходе общего (1), альтернативного (2) или остаточного дыхания (3). *, ** – различия статистически значимы при $P < 0.05$ ($p = 0.004$ и $p = 0.024$ соответственно; использован U -критерий Манна–Уитни); (б) – скорость дыхания, выраженная в процентах от общего поглощения кислорода в ходе активности цитохромного (1), альтернативного пути дыхания (2) или остаточного дыхания (3). 13s – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; Дт – дикий тип; 20 – выращивание при 20°C в течение 28 сут; 25 – выращивание при 25°C в течение 21 сут. Измерение скорости поглощения кислорода проводили в полярнографической ячейке при температуре 20°C или 25°C, соответственно. Приведены средние значения, ошибки представлены доверительным интервалом, $n = 18–25$.

ных мембран, возможно, вследствие снижения уровня АФК. Все эти эффекты наблюдались на поздних этапах вегетации (стадия развития 12 листа) и приводили к замедлению увядания растений и продлению вегетативной фазы развития.

В наших экспериментах, проводившихся на ранних этапах развития растений, наоборот, активные ростовые процессы сопровождались повышенным уровнем генерации супероксидного аниона в нетрансформированных растениях при действии субоптимальной температуры 20°C (рис. 7), что свидетельствует о развитии внутриклеточного окислительного стресса. В случае трансгенных растений табака достоверных различий в содержании формазана не обнаружено (рис. 7).

Такие различия в реакции на стрессовое воздействие пониженной температурой могут определяться повышенной экспрессией трансгена. Считается, что экспрессия генов *NDB* и *AOX* (альтернативной оксидазы) растений взаимосвязаны. Уровень экспрессии *AOX1a* у *A. thaliana* определяет уровень экспрессии гена *AtNDB2* в контроле и в условиях повышенного УФ облучения [34]. Экспрессия этих генов происходит синхронно в ответ на различные абиотические стрессы, что предполагает совместную регуляцию общими промоторными элементами [19, 35, 36]. В связи с этим не удивительно, что в трансгенных растениях табака *N. sylvestris* с гиперэкспрессией гена *StNDB1* картофеля (*Solanum tuberosum* L.) наблюдалось

повышение активности собственной АОХ [37]. Схожий эффект наблюдался ранее в ряде аналогичных трансгенных линий в работе Sweetman с соавт. [14].

Координированная экспрессия генов *NDB2* и *АОХ* и совместная работа кодируемых ими белков обеспечивает формирование полноценного функционального нефосфорилирующего пути транспорта электронов [14]. Вероятно, в полученных нами трансгенных растениях табака также вследствие повышенной экспрессии *NDB2 A. thaliana* наблюдается активация дыхания через НФП (*NDB2 – Q/QH2 – АОХ*), поскольку скорость альтернативного дыхания у трансформантов, выращенных при 20°C, оказалась достоверно выше, чем у растений дикого типа, выращенных при такой же температуре (рис. 6а). Вероятно это повышение скорости альтернативного дыхания и определяет сниженный уровень АФК в трансгенных растениях.

В наших экспериментах даже воздействие субоптимальной температурой на растения приводит к выраженному росту скорости общего дыхания у трансгенных растений (рис. 6а), что лишний раз подтверждает защитную функцию НФП при охлаждении – предотвращение перевосстановления пула убихинола и образования избытка АФК в митохондриальной ЭТЦ и рассеяние энергии дыхания в виде тепла [38].

Как следствие, фенотипические различия скорости роста трансгенных и нетрансформированных растений могут быть также следствием разобщения дыхания и активизации НФП в результате снижения энергетической эффективности дыхания, которое в некоторых условиях приводит к снижению скорости роста и продуктивности [14, 39]. Другим возможным объяснением низкой скорости роста в сочетании с повышенной скоростью дыхания у трансгенных растений может быть перенаправление энергетического вклада дыхания на другие нужды, помимо роста. Например, показано, что благодаря активности АОХ рост суспензионной культуры клеток табака может настраиваться на снижение доступности азота и фосфора в среде культивирования, при этом сокращается вклад потребляемого сахара в прирост культуры [40]. В таком случае зависимость скорости роста трансгенных растений от повышения активности *AtNDB2* (и, возможно, от активности АОХ) представляется специфической настройкой, призванной оптимизировать соотношение дыхания, ростовых и адаптационных затрат.

Таким образом, нами получены трансгенные растения табака с измененной экспрессией гена, кодирующего один из ключевых компонентов альтернативного пути переноса электронов в митохондриях – *AtNDB2*, характеризующиеся более

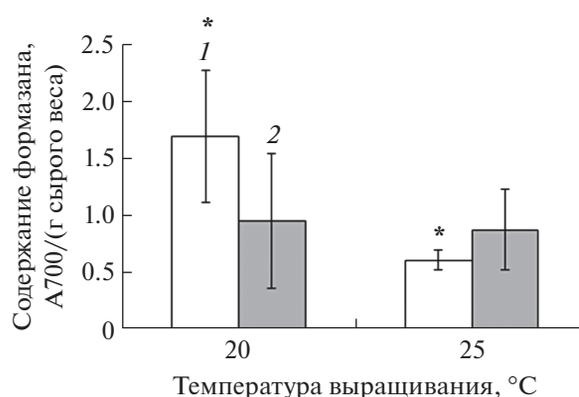


Рис. 7. Влияние температуры выращивания на уровень генерации супероксидного аниона в листьях табака. 1 – дикий тип; 2 – трансформант с повышенной экспрессией гена *NDB2 A. thaliana*; 20 – выращивание при 20°C в течение 28 сут; 25 – выращивание при 25°C в течение 21 сут. Приведены средние значения, ошибки представлены доверительным интервалом, $n = 3-5$. * – различия статистически значимы при $P < 0.05$ (использован *U*-критерий Манна–Уитни).

низкой по сравнению с растениями дикого типа скоростью роста, снижающейся еще больше при действии субоптимальной температуры. Замедление роста, а также наблюдаемое у трансгенных растений в отличие от контрольных снижение уровня генерации супероксидного аниона сопровождаются усилением общего и альтернативного дыхания. Разобщение дыхания и активизация НФП, вероятно, снижают энергетическую эффективность дыхания и, как следствие определяют наблюдаемые фенотипические различия в скорости роста трансгенных и нетрансформированных растений. Полученные растения с повышенной экспрессией гена *AtNDB2*, кодирующего внешнюю NADH дегидрогеназу *A. thaliana*, являются интересной моделью для изучения температурных настроек и стрессовых реакций растений.

Авторы выражают благодарность анонимным рецензентам. Авторы выражают благодарность О.И. Грабельных и Е.А. Поляковой за помощь и ценные рекомендации при исследовании дыхательной активности. Для выполнения работы было использовано оборудование Центра коллективного пользования “Биоаналитика” СИФИБР СО РАН.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00097, <https://rscf.ru/project/23-24-00097/>.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
2. *Gill S.S., Tuteja N.* Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. P. 909. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
3. *Nadarajah K.K.* ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 15. P. 5208. <https://doi.org/10.3390/ijms21155208>
4. *Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R.* Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. № 6. P. 691. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
5. *Hu C.-H., Wang P.-Q., Zhang P.-P., Nie X.-M., Li B.-B., Tai L., Liu W.-T., Li W.-Q., Chen K.-M.* NADPH oxidases: the vital performers and center hubs during plant growth and signaling // *Cells.* 2020. V. 9. № 2. P. 437. <https://doi.org/10.3390/cells9020437>
6. *Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.* Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. № 1. P. 185. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x>
7. *Kristiansen K.A., Jensen P.E., Møller I.M., Schulz A.* Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H2DCFDA and confocal laser microscopy // *Physiol. Plant.* 2009. V. 136. № 4. P. 369. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01243.x>
8. *Bartoli C.G., Gómez F., Martínez D.E., Guíamet J.J.* Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 403. P. 1663. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh199>
9. *Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C.* The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. № 1. P. 253. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00775.x>
10. *Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. № 2. P. 259. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
11. *Blokhina O., Fagerstedt K.V.* Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. № 5. P. 359. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.007>
12. *Michalecka A.M., Svensson A.S., Johansson F.I., Agius S.C., Johanson U., Brennicke A., Binder S., Rasmusson A.G.* Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. № 2. P. 642. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024208>
13. *Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J.* Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: intraorganellar location and expression // *Plant Cell Physiol.* 2006. V. 47. № 1. P. 43. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci221>
14. *Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., Soole K.L.* AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress // *Plant Physiol.* 2019. V. 181. № 2. P. 774. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00877>
15. *Stupnikova I., Benamar A., Tolleter D., Grelet J., Borovskii G., Dorne A.J., Macherel D.* Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. № 1. P. 326. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073015>
16. *Fedoseeva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedyaeva A.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Borovskii G.B., Rikhvanov E.G.* The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02736-7>
17. *Fang J., Beattie D.S.* External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 34. № 4. P. 478. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01328-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01328-x)
18. *Carneiro P., Duarte M., Videira A.* Characterization of apoptosis-related oxidoreductases from *Neurospora crassa* // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. e34270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034270>
19. *Smith C., Barthelet M., Melino V., Smith P., Day D., Soole K.* Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. № 7. P. 1222. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr073>
20. *Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Araújo W.L., Escobar M.A., Geisler D.A., Aidemark M., Lager I., Fernie A.R., Ribas-Carbó M., Rasmusson A.G.* Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. № 5. P. 881. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu021>
21. *Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Araújo W.L., Aidemark M., Fernández-Fernández M., Fernie A.R., Ribas-Carbó M., Rasmusson A.G.* Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in *Arabidopsis thaliana* affects central metabolism and vegetative growth // *Mol. Plant.* 2014. V. 7. № 2. P. 356. <https://doi.org/10.1093/mp/sst115>
22. *Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhima T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Bashmakov V.Y., Popov V.N., Borovskii G.B., Voinikov V.K.* Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings // *Biochem. (Mosc).* 2014. V. 79. № 6. P. 506. <https://doi.org/10.1134/S0006297914060030>

23. Allen D.J., Ort D.R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. № 1. P. 36.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01808-2](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01808-2)
24. Aghaee A., Moradi F., Zare-Maivan H., Zarinkamar F., Irandoost H.P., Sharifi P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage // African J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 7617.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.069>
25. Yang L.Y., Yang S.L., Li J.Y., Ma J.H., Pang T., Zou C.M., He B., Gong M. Effects of different growth temperatures on growth, development, and plastid pigments metabolism of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants // Bot. Stud. 2018. V. 59. № 5. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s40529-018-0221-2>
26. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
27. Chen P.Y., Wang C.K., Soong S.C., To K.Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants // Mol. Breed. 2003. V. 11. № 4. P. 287.
<https://doi.org/10.1023/A:1023475710642>
28. Belide S., Vanhercke T., Petrie J.R., Singh S.P. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos // Plant Methods. 2017. V. 13. № 109. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0260-9>
29. Schmidt G.W., Delaney S.K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress // Mol. Genet. Genomics. 2010. V. 283. № 3. P. 233.
<https://doi.org/10.1007/s00438-010-0511-1>
30. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
31. Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species contents in *Arabidopsis* cell culture but not in whole plants // Biol. Plant. 2012. V. 56. P. 635.
<https://doi.org/10.1007/s10535-012-0115-1>
32. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes // Cell. 1986. V. 44. P. 283.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
33. Gygi S.P., Rochon Y., Franz B.R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. № 3. P. 1720.
<https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.1720>
34. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rybak A.V., Malyshev R.V. Altered levels of AOX1a expression result in changes in metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation // Plant Sci. 2020. V. 291. P. 110332.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110332>
35. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. № 2. P. 193.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-5514-7>
36. Yoshida K., Noguchi K. Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves // Plant Cell Physiol. 2009. V. 50. № 8. P. 1449.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcp090>
37. Liu Y.J., Norberg F.E.B., Szilagy A., De Paepe R., Akerlund H.E., Rasmusson A.G. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP(+) ratio in transgenic *Nicotiana sylvestris* // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 251.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcn001>
38. Gabelnych O.I. The energetic functions of plant mitochondria under stress // J. Stress Physiol. Biochem. 2005. V. 1. № 1. P. 37.
39. Guo M., Liu J., Hou L., Zhao S., Zhang N., Lu L., Zhao X. The mitochondria-localized protein OsNDB2 negatively regulates grain size and weight in rice // Crop J. 2022. V. 10. P. 1819.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.07.016>
40. Sieger S.M., Kristensen B.K., Robson C.A., Amirsadeghi S., Eng E.W., Abdel-Mesih A., Møller I.M., Vanlerberghe G.C. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. № 416. P. 1499.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri146>