

ORIGINAL ARTICLE

Change of *AOX1a* Expression, Encoding Mitochondrial Alternative Oxidase, Influence on the Frost-Resistance of *Arabidopsis* Plants

Olga I. Grabelnych^{1,2*}, Olga A. Borovik¹, Tamara P. Pobezhimova¹,
Nina A. Koroleva¹, Irina V. Lyubushkina^{1,2}, Natalya S. Zabanova^{1,2},
Victor K. Voinikov¹

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

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

*E-Mail: grolga@sifibr.irk.ru

Received November 1, 2016

The resistance of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Columbia ecotype) plants: Col-0 line (wild type), AS-12 line (plants transformed with the construct carrying the *AOX1a* gene under control of the CAMV 35S promoter in the antisense orientation) and line XX-2 (plants transformed with the *AOX1a* gene construct in the sense orientation) (Umbach *et al.*, 2005), to action of subzero temperature has been studied. It is shown that change of the *AOX1a* expression is accompanied by change of the AOX contribution in respiration and increase of the base frost-resistance of *Arabidopsis* plants. In the leaves of plants with overexpression of *AOX1a* was reduced activity of total superoxide dismutase (SOD), but was increased activity of guaiacol peroxidase and was less content of hydrogen peroxide. It was found that cold hardening during 7 days at 5°C increases the resistance of plants to the subsequent action of subzero temperature regardless of *AOX1a* expression degree. The hardening lead to activation of respiration, increase of the contribution of AOX in the respiration, a significant increase of the water-soluble carbohydrates content and increase of the activity SOD and total guaiacol peroxidases in leaves of all lines the plants. In hardened plants of *Arabidopsis* wild type and *AOX1a* transformants were detected differences in the contents of individual types of reactive oxygen species and the activity of antioxidant enzymes. The trend to decrease of hydrogen peroxide content in lines with altered expression of *AOX1a* was observed, but content of superoxide anion radical (SAR) was significantly lower in the AS-12 line compared with the Col-0 and XX-2 plants after hardening. The low content of SAR in leaves of AS-12 line was partly caused by increase of activity total SOD. Thus, we have identified differences in the basic frost-resistance of *Arabidopsis* plants with altered *AOX1a* expression, but significant differences in frost-resistance of hardened plants of wild-type and lines with altered *AOX1a* expression was not found. It was concluded that the frost-resistance of plants depends on the activity of AOX, but the decrease of its activity can be compensated by the activation of other protective systems including antioxidant enzymes.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, frost-resistance, alternative oxidase, respiration, water-soluble carbohydrates, reactive oxygen species, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase.

Альтернативная оксидаза (АО) наряду с цитохромоксидазой является терминальной оксидазой дыхательной цепи митохондрий растений и катализирует окисление убихинола с восстановлением O_2 до H_2O , при этом она не является протон-транслоцирующей и при транспорте электронов через АО обходятся два пункта сопряжения в дыхательной цепи – комплексы III и IV (Lambers *et al.*, 2005). Альтернативная цианид-резистентная оксидаза митохондрий – высокорегулируемый фермент, который принимает участие в процессах адаптации растений к различным абиотическим и биотическим стрессам (Vanlerberghe, 2013). У *Arabidopsis thaliana* идентифицировано 5 генов, кодирующих АО (AOX1a-d, AOX2) (Considine *et al.*, 2002). Из пяти генов изоформа AOX1a наиболее активно индуцируется стрессами или ингибированием цитохромного пути (Clifton *et al.*, 2006; Borecky *et al.*, 2006). Возможными функциями АО в условиях действия низкой температуры на растения являются: участие в термогенезе (Nagy *et al.*, 1972; Meeuse, 1975; Seymour, Schultze-Motel, 1999; Grabelnych *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011); участие в предотвращении образования активных форм кислорода (АФК) (Purvis and Shewfelt, 1993; Popov, 2003; Sugie *et al.*, 2006; Grabelnych *et al.*, 2011); участие совместно с ротенон-нечувствительными НАД(Ф)Н-дегидрогеназами (НАД(Ф)Н-ДГ II типа) в окислении цитозольного или матричного НАД(Ф)Н (Michalecka *et al.*, 2003; Borovik *et al.*, 2013; Borovik, 2015); защита фотосинтетического аппарата от фотоингибирования при избыточном освещении (Zhang *et al.*, 2010).

Использование суспензионной культуры клеток табака с измененной экспрессией AOX1a обеспечили доказательства антиоксидантной роли АО в растениях (Maxwell *et al.*, 1999). Перенос гена AOX1a пшеницы (WAOX1a) в клетки *Arabidopsis thaliana* подтвердил гипотезу об антиоксидантной функции АО в листьях растений при низкой температуре (Sugie *et al.*, 2006). На растениях табака было показано, что при низкой температуре сверхэкспрессия AOX1a приводит к снижению

содержания одного из продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) и благоприятствует накоплению в клетках глюкозы и фруктозы (Wang *et al.*, 2011). Повышение содержания водорастворимых углеводов, как известно, является одним из механизмов низкотемпературной адаптации растений (Trupova, 2007).

Исследования, проведенные на растениях арабидопсиса антисенсовой и сверхэкспрессирующей AOX1a линий, не выявили значительных различий в содержании АФК в контрольных условиях, однако при обработке ингибитором цитохромного пути цианидом калия в листьях и корнях дефицитных по АО растений наблюдался повышенный уровень АФК (Umbach *et al.*, 2005). При росте на холоде в растениях арабидопсиса со сверхэкспрессией AOX1a увеличение продуктов ПОЛ было менее выражено, чем у растений дикого типа, растений, трансформированных пустым вектором и растений со сниженной экспрессией AOX1a (Fiorani *et al.*, 2005). В отличие от целых растений, у которых содержание АФК не различалось между линиями, в суспензионной культуре клеток арабидопсиса были выявлены различия в уровне АФК, причем в культуре клеток со сверхэкспрессией AOX1a наблюдали снижение, а в культуре клеток со сниженной экспрессией AOX1a – увеличение содержания супероксид анион-радикала (O₂⁻) и пероксида водорода (Tarasenko *et al.*, 2012). Сходная тенденция прослеживалась при обработке культуры клеток антимицином А, однако, что интересно, при обработке прооксидантами увеличение содержания АФК и снижение выживаемости было выше в культуре клеток, сверхэкспрессирующих AOX1a (Tarasenko *et al.*, 2012). На растениях арабидопсиса с выключенной экспрессией AOX1a (линия AOX1a knock-out) было установлено, что если у дикого типа низкая температура приводит к значительной экспрессии мРНК AOX1a и увеличению цианид-резистентного дыхания в листьях, то у линии с выключенной экспрессией AOX1a в ответ на снижение температуры увеличивается цианид-чувствительное дыхание и экспрессия NDB2 и UCP1

(Watanabe et al., 2008). У растений линии *AOX1a* knock-out было ниже содержание МДА и выше экспрессия генов антиоксидантных ферментов (*GPX6*, *CAT1*, *MSD1* и *FSD1*). Усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов и снижение содержания МДА наблюдали и при холодной обработке растений табака с сильной супрессией *AOX1a* (Wang et al., 2011). Эти данные свидетельствуют о том, что АО является важным компонентом антиоксидантной защитной системы клеток растений, ее отсутствие при низкой температуре приводит к повышению экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной защите, а также активирует другие пути альтернативного дыхания в митохондриях (Watanabe et al., 2008).

Из данных, представленных выше, следует, что имеющиеся в литературе сведения относительно ответной реакции растений с измененной экспрессией *AOX1a* на действие низкой положительной температуры являются неоднозначными. С одной стороны показано, что экспрессия гена *AOX1a* играет важную роль в повышении устойчивости растений к низкой температуре (Wang et al., 2011), с другой стороны – отсутствие данного гена или снижение его экспрессии приводит к активации экспрессии генов НАД(Ф)Н-ДГ II типа, разобщающих белков и антиоксидантных ферментов (Watanabe et al., 2008), что также может приводить к росту холодо- и морозоустойчивости. Однако данных по участию альтернативной оксидазы в ответной реакции растений на действие отрицательной температуры нет.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение устойчивости к действию отрицательной температуры растений *Arabidopsis thaliana* со сниженной и повышенной экспрессией гена *AOX1a*.

MATERIALS AND METHODS

В работе использовали растения *A. thaliana* (L.) Неупн линии Col-0 (растения дикого типа, экотип Columbia), линии AS-12 (растения, трансформированные конструкцией, несущей ген *AOX1a* под контролем промотора *CAMV 35S* в антисенсовой ориентации) и линии XX-2 (растения,

трансформированные конструкцией, несущей ген *AOX1a* в сенсовой ориентации) (Umbach et al., 2005). Семена линий AS-12 и XX-2 были получены из Nottingham Arabidopsis Stock Centre (UK), stock number N6707 и N6591, соответственно, и любезно предоставлены В.И. Тарасенко (СИФИБР СО РАН).

Растения выращивали в стаканчиках объемом 200 см³ на опытной станции Фитотрон СИФИБР СО РАН в камере BINDER KBW 720 (Германия) при температуре 23/20 °С (день/ночь), 16 часовом фотопериоде и освещенности 250 мкмоль/(м²·с). В качестве субстрата для выращивания использовали торф, раз в неделю проводили подкормку ½ раствора Кнопа. В возрасте 36-38 дней растения подвергали холодovому закаливанию, которое проводили в камере BINDER KBW 720 (Германия) в течение 7 дней при 5 °С, 24 часовом фотопериоде и освещенности 180 – 200 мкмоль/(м²·с). Морозоустойчивость контрольных (в возрасте 40 дней) и закаленных растений оценивали путем промораживания растений в камере BINDER MKT 240 (Германия) при температурах -2, -4, -6 и -8 °С в течение 2 часов и последующего отрастания в течение 9 суток.

Количественное содержание сахаров в тканях листьев определяли с антроновым реактивом (Dishe, 1967). Плотность окрашенного раствора измеряли спектрофотометрически при 620 нм. Концентрацию водорастворимых углеводов выражали в процентах на суховоздушный вес проростков.

Определение интенсивности дыхания листьев проводили полярографически с платиновым электродом закрытого типа (электрод Кларка) в ячейке объемом 1,4 мл при 26 °С на приборе Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия). Листья предварительно инфильтровали с помощью шприца в растворе, содержащем 100 мМ сахарозы, 10 мМ MOPS-КОН (рН 6,6) и 0,2 мМ CaCl₂, с добавлением или без добавления ингибиторов дыхания. Для ингибирования цитохромного пути (ЦП) дыхания использовали 1,2 мМ KCN, для ингибирования альтернативного пути (АП) дыхания – 3 мМ бензгидроксамовую кислоту (БГК). Такие же концентрации ингибиторов добавляли в ячейку

полярографа. Поглощение кислорода, оставшееся после добавления KCN и БГК, считали неспецифическим и не принимали в расчет дыхательной активности.

Содержание пероксида водорода определяли с помощью окрашивания 3,3'-диаминобензидином (ДАБ) (Tarasenko *et al.*, 2012). Для этого листья инфильтровали в шприце (Александров, 1954) раствором ДАБ (0,2 мг/мл) в 10 мМ Трис-ацетатном буфере (рН 5,0) и инкубировали в темноте в течение 5 ч, затем помещали в 70% этанол и инкубировали при 80 °С до полного извлечения хлорофилла. Коричневый осадок, сформировавшийся во время полимеризации ДАБ, экстрагировали из ткани растиранием в ступке с 0,2 М хлорной кислотой. После центрифугирования при 13000 g в течение 10 мин оптическую плотность супернатанта измеряли спектрофотометрически при 450 нм. Содержание пероксида водорода рассчитывали в единицах (ед.) оптической плотности полимеров ДАБ на 1 г сырого веса.

Содержание САР определяли с помощью окрашивания нитросиним тетразолием (НСТ) (Tarasenko *et al.*, 2012). Для этого листья инфильтрировали в шприце раствором НСТ (0,05 мг/мл) в 10 мМ КН₂РО₄ (рН 7,8) и инкубировали в темноте в течение 1 ч, затем помещали в 70% этанол и инкубировали при 80 °С до полного извлечения хлорофилла. Голубой осадок формазана, сформировавшийся во время реакции, экстрагировали из ткани растиранием в смеси 2 М КОН и диметилсульфоксида (в соотношении 1 : 1). После центрифугирования при 13000 g в течение 10 мин оптическую плотность супернатанта измеряли спектрофотометрически при 700 нм. Содержание САР рассчитывали в ед. оптической плотности на 1 г сырого веса.

Активность общей СОД определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление НСТ (Beauchamp and Fridovich, 1971). Активность СОД выражали в ед. оптической плотности на 1 мг белка.

Активность гваяколовых пероксидаз определяли по изменению оптической плотности при 580 нм в

реакционной смеси следующего состава: 0,92 мл цитратно-фосфатного буфера (рН 5,5), 0,5 мл 0,3% Н₂O₂, 0,08 мл гваякола и 0,5 мл пробы. Активность фермента выражали в нКат на 1 мг белка (Bergmeyer, 1983).

Было проведено 3-6 независимых экспериментов, в каждом из которых повторность была не менее чем 3-х кратной. Рассчитаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

RESULTS AND DISCUSSION

Выживаемость контрольных и закаленных растений арабидопсиса с измененной экспрессией AOX1a после действия отрицательных температур

Ранее в работе A.L. Umbach с соавт. (2005) были охарактеризованы линии арабидопсиса с измененной экспрессией гена AOX1a. В нашей работе использовали растения арабидопсиса поколения F₄ линий AS-12 (со сниженной экспрессией AOX1a) и XX-2 (с повышенной экспрессией AOX1a). Сохранение факта трансформации у растений поколения F₄ было проверено в работе (Tarasenko *et al.*, 2012).

Как видно из Fig. 1 растения арабидопсиса дикого типа и растения с измененной экспрессией AOX1a не имели никаких фенотипических отличий. На отсутствие фенотипических отличий при нормальных условиях роста у растений с измененной экспрессией AOX1a указывали и другие авторы (Vanlerberghe *et al.*, 1994; Fiorani *et al.*, 2005; Umbach *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2008).

При изучении влияния отрицательных температур на выживаемость растений арабидопсиса, выращенных в контрольных условиях, нами показано, что растения с повышенной экспрессией AOX1a (сенсовая линия XX-2) имеют большую морозоустойчивость, по сравнению с диким типом (Fig. 2). Однако обнаружено, что морозоустойчивость растений со сниженной экспрессией AOX1a (антисенсовая линия AS-12) также выше по сравнению с диким типом. Если при температуре -6 °С выживало всего 20% контрольных растений дикого типа, то с измененной экспрессией AOX1a – около 70% растений. Независимо от экспрессии AOX1a все растения

арабидопсиса погибали при температуре $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Следовательно, нам удалось выявить тот факт, что изменение экспрессии гена *AOX1a*, кодирующего альтернативную оксидазу митохондрий, может приводить к существенным перестройкам в метаболизме клетки, направленным на повышение устойчивости растений к низкой температуре.

Далее была проанализирована морозоустойчивость растений арабидопсиса предварительно закаленных при $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 суток. Ранее на озимой пшенице было показано (Borovik, 2015), что обработка растений температурой $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 суток при непрерывном освещении наиболее эффективна для формирования закаленного состояния и повышения морозоустойчивости, поскольку приводит к значительному увеличению содержания в тканях водорастворимых углеводов. Как следует из полученных данных, закаливание значительно повышало морозоустойчивость растений арабидопсиса (Fig. 2). Закаленные растения дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a* выдерживали 2-х часовую экспозицию при температуре $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом морозоустойчивость после холодового закаливания повышалась независимо от экспрессии гена *AOX1a*.

На основе полученных данных можно заключить, что изменение экспрессии *AOX1a* оказывает влияние на развитие морозоустойчивости растений, однако процессы, происходящие в клеточном метаболизме растений при действии низких температур, направлены на компенсацию снижения активности АО и, вероятно, связаны с активацией других защитных механизмов. Такой факт отмечали ранее на растениях арабидопсиса с выключенной экспрессией *AOX1a* (Watanabe et al., 2008), когда в ответ на снижение температуры у растений с отсутствием АО возрастало цианид-чувствительное дыхание и экспрессия генов таких белков как внешняя НАДН-ДГ (*NDB2*) и разобщающий белок (*UCP1*), а также ряд генов, кодирующих антиоксидантные ферменты. Альтернативные НАД(Ф)Н-ДГ и разобщающие белки, как известно, так же как и АО, вносят вклад в развитие морозоустойчивости растений (Grabelnych et al.,

2014).

Некоторые физиолого-биохимические параметры, определяющие устойчивость растений арабидопсиса с измененной экспрессией *AOX1a* к отрицательным температурам

В механизмах повышения устойчивости растений к низкой температуре важную роль играет поддержание процесса дыхания и регуляция образования АФК. Как видно из Fig. 3 интенсивность дыхания листьев контрольных растений арабидопсиса достоверно не отличалась между линиями, но в зависимости от изменения экспрессии *AOX1a* изменялось участие АО в дыхании. Так, если вклад АП в дыхание листьев дикого типа составлял около 26%, то в листьях AS-12 он понижался до 8%, а в листьях XX-2 повышался до 50% (Fig. 3). Холодовое закаливание вызывало активацию дыхания в листьях арабидопсиса независимо от экспрессии *AOX1a*, при этом усиление интенсивности дыхания было наибольшим у дикого типа и по сравнению с дыханием в контрольных условиях было в 2 раза выше (Fig. 3). Наряду с изменением интенсивности дыхания при действии низкой температуры на растения изменялся и вклад альтернативного и цитохромного путей в дыхание. Так, у дикого типа (*Col-0*) усиление интенсивности дыхания в равной мере обеспечивалось увеличением вклада в дыхание и ЦП, и АП, у линии со сниженной экспрессией *AOX1a* (AS-12) в некоторой степени происходило увеличение вклада в дыхание цитохромного и альтернативного путей, а у линии с повышенной экспрессией *AOX1a* (XX-2), наоборот, снижался вклад в дыхание ЦП и еще больше увеличивался вклад АП.

Поскольку существуют данные о связи дыхания и активности АО с содержанием сахаров в тканях растений (Wang et al., 2011), был проведен анализ содержания сахаров в листьях растений арабидопсиса, различающихся по экспрессии *AOX1a*. Показано, что в оптимальных условиях роста различие в активности АО не влияло на содержание сахаров, которое у 40-суточных растений составляло 2,8-3,0% от суховоздушного веса (Fig. 4). Низкотемпературное закаливание приводило к значительному увеличению содержания сахаров в листьях арабидопсиса (Fig. 4). Сахара выполняют

осморегуляторную и криопротекторную функции, а также участвуют в поддержании про/антиоксидантного баланса в клетке (Sou  e *et al.*, 2006), поэтому их накопление при действии на растения арабидопсиса низкой положительной температуры еще раз подтверждает эффективность выбранной в работе температурной обработки. В случае растений дикого типа увеличение содержания сахаров под действием низкой температуры происходило в 4,8 раза, у линии с пониженной экспрессией AOX1a – в 5,9 раз, а у линии с повышенной экспрессией AOX1a – в 5,3 раза. Более значительное увеличение содержания сахаров в тканях растений арабидопсиса линии AS-12 может быть одним из механизмов, благоприятствующих повышению морозоустойчивости.

Низкая температура вызывает развитие окислительного стресса у растений, связанного с увеличением содержания АФК и продуктов ПОЛ (Suzuki, Mittler, 2006; Xu *et al.*, 2013). Активация АО в митохондриях холодоустойчивых растений при низких температурах, по-видимому, является защитным механизмом, предотвращающим генерацию АФК при последующем действии отрицательных температур (Sugie *et al.*, 2006; Grabel'nyh *et al.*, 2011). Анализ содержания ряда форм АФК (супероксид анион-радикала и пероксида водорода) и общей активности СОД и гваяколовых пероксидаз проводили в листьях растений арабидопсиса, различающихся по активности АО, в контрольных условиях и подвергнутых холодовому закаливанию. Оказалось, в контрольных условиях растения дикого типа и растения с измененной экспрессией AOX1a по содержанию АФК в листьях достоверно не различались (Fig. 5), хотя наблюдалась тенденция к снижению содержания пероксида водорода у растений с измененной экспрессией AOX1a. Нами установлено, что изменение экспрессии гена AOX1a оказывает влияние на активность таких антиоксидантных ферментов как СОД и растворимые гваяколовые пероксидазы. При этом в контрольных условиях роста у линии XX-2 со сверхэкспрессией AOX1a активность СОД была ниже (на 24%), а активность

гваяколовых пероксидаз выше (на 51%) по сравнению с диким типом и линией AS-12 (Fig. 6). Полученные нами данные о различиях в активности антиоксидантных ферментов у линии со сверхэкспрессией AOX1a лишней раз доказывают, что изменение экспрессии одного гена может существенно изменять клеточный метаболизм, подстраивая его под нужды клетки.

Низкая закаливающая температура приводила к повышению общей активности СОД и гваяколовых пероксидаз в листьях арабидопсиса всех линий (Fig. 6). Наибольшее увеличение активности СОД наблюдали в листьях растений арабидопсиса линии AS-12, в этих условиях активность фермента была в 2,5 раза выше по сравнению с контрольными растениями арабидопсиса. Такое значительное увеличение активности общей СОД под действием низкой температуры обусловило резкое снижение содержания САР в листьях арабидопсиса этой линии (на 78%). В листьях растений дикого типа также наблюдали активацию СОД (в 1,9 раза) и снижение содержания САР (на 50%) после действия закаливающей температуры. В листьях арабидопсиса линии XX-2 активность СОД была менее выражена по сравнению с диким типом и линией AS-12, а снижение САР было недостоверным. В отличие от активности СОД, активность гваяколовых пероксидаз возрастала в большей степени у линии XX-2 (в 2,3 раза), в этих же условиях наблюдали снижение содержания пероксида водорода (на 36%) (Fig. 6). У линии AS-12 (со сниженной экспрессией AOX1a) увеличение активности гваяколовых пероксидаз (в 1,8 раза) также сопровождалось достоверным снижением содержания пероксида водорода в листьях (на 39%). Как можно видеть из полученных данных, изменение экспрессии AOX1a, кодирующего альтернативную оксидазу митохондрий, приводит к изменению активности антиоксидантных ферментов. При этом увеличение экспрессии AOX1a у линии XX-2 сопровождается активацией гваяколовых пероксидаз и снижением активности СОД.

Как известно, одной из функций АО является использование электронов для предотвращения сверхвосстановленного состояния дыхательной

цепи митохондрий (Purvis and Shewfelt, 1993; Maxwell *et al.*, 1999; Popov, 2003). В норме содержание АФК в митохондриях поддерживается на низком уровне благодаря наличию антиоксидантных систем, призванных проводить постоянную ликвидацию АФК (Blokhina and Fagerstedt, 2010). Однако в стрессовых для клетки условиях, например при действии на растения низкой температуры, содержание АФК начинает увеличиваться, и развивается окислительный стресс (Suzuki and Mittler, 2006; Xu *et al.*, 2013). Активация альтернативной оксидазы увеличивает скорость электронного потока и предотвращает свёрхвосстановление дыхательной цепи и генерацию САР, сходную с АО антиоксидантную функцию в митохондриях растений могут выполнять разобщающие белки (Blokhina and Fagerstedt, 2010). Благодаря разобщающим белкам протоны обратно транспортируются в матрикс без образования АТФ, что снижает образование АФК. Можно предположить, что снижение экспрессии *AOX1a* у линии AS-12 запускает экспрессию разобщающих белков, функционирование которых препятствует образованию АФК и способствует повышению устойчивости незакаленных растений к низкой температуре. Повышение экспрессии *UCP1* у арабидопсиса с выключенной экспрессией *AOX1a* было показано в работе (Watanabe *et al.*, 2008).

В нейтрализации АФК у растений принимают участие антиоксидантные ферменты. Так, в матриксе митохондрий образующийся в дыхательной цепи

САР быстро нейтрализуется до пероксида водорода с помощью СОД, а пероксид водорода удаляется каталазой и пероксидазами, использующими различные субстраты в качестве доноров электронов. Как показано выше, в процессе закаливания растений арабидопсиса в листьях возрастает общая активность СОД и гваяколовых пероксидаз (Fig. 6) и снижается генерация САР и пероксида водорода (Fig. 5). При этом в тканях закаленных растений значительно увеличивается содержание сахаров (Fig. 4), интенсивность дыхания и вклад АО в дыхание (Fig. 3), что сопровождается повышением морозоустойчивости растений (Fig. 2). Отличием закаленных растений с измененной экспрессией *AOX1a* от закаленных растений дикого типа является изменение антиоксидантного статуса за счет снижения и/или повышения активности антиоксидантных ферментов и повышения и/или снижения образования отдельных форм АФК. Снижение активности СОД у линии с повышенной активностью АО (линия XX-2) (Fig. 6) может свидетельствовать о том, что АО защищает митохондрии от образования САР. Следует заметить, что изменение дыхательного метаболизма и антиоксидантного статуса у линий с измененной экспрессией *AOX1a* повышает устойчивость незакаленных растений арабидопсиса к низкой температуре, а происходящие во время закаливания физиолого-биохимические изменения позволяют выживать растениям дикого типа и с измененной экспрессией *AOX1a*.

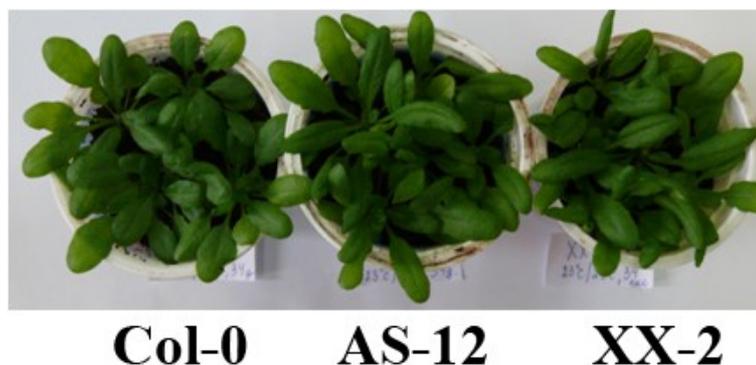


Figure 1. Внешний вид растений арабидопсиса дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a* в возрасте 34 суток.

Обозначения: Col-0 – дикий тип, AS-12 – растения со сниженной экспрессией гена *AOX1a*, XX-2 – растения с повышенной экспрессией гена *AOX1a*.

Контрольные растения



Закаленные растения



Figure 2. Морозоустойчивость контрольных и закаленных в течение 7 суток при 5 °C растений арабидопсиса дикого типа и линий с измененной экспрессией AOX1a. Растения подвергали действию отрицательных температур в течение 2 часов и анализировали их выживаемость через 9 суток.

Обозначения: как на Fig. 1.

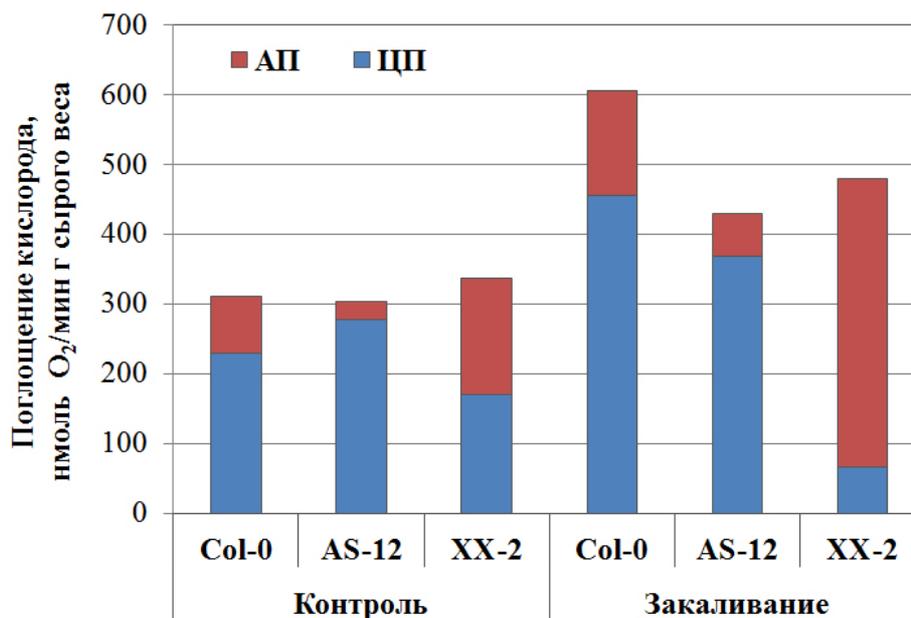


Figure 3. Интенсивность дыхания и вклад альтернативной оксидазы в дыхание листьев растений арабидопсиса дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a* в контрольных условиях и после закаливания в течение 7 суток при 5 °C.

Обозначения: Col-0, AS-12, XX-2 как на Fig. 1; АП – альтернативный путь дыхания, связанный с функционированием альтернативной оксидазы, ЦП – цитохромный путь дыхания, связанный с функционированием цитохромоксидазы.

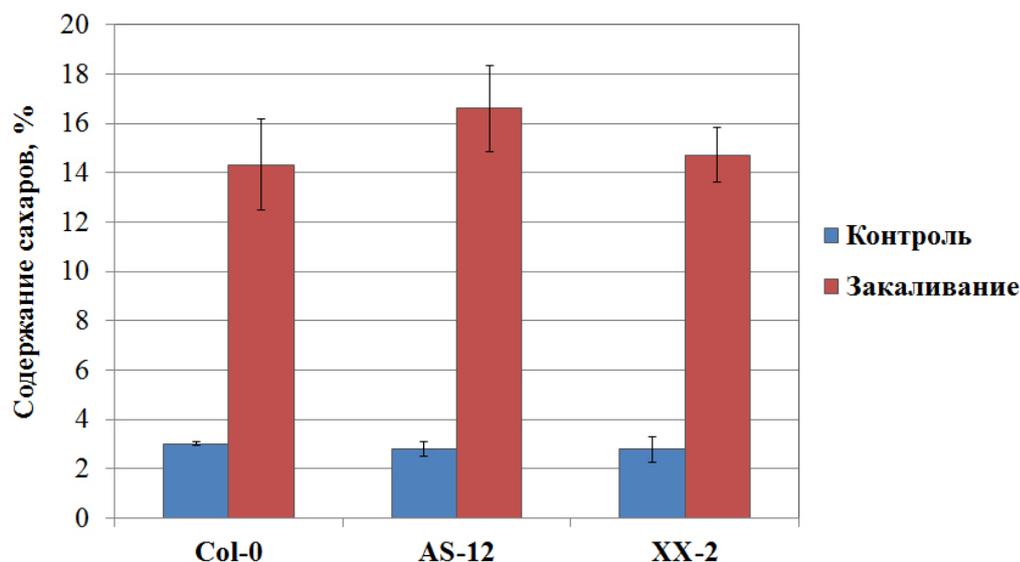


Figure 4. Содержание водорастворимых углеводов в листьях растений арабидопсиса дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a* в контрольных условиях и после закаливания в течение 7 суток при 5 °C.

Обозначения: как на Fig. 1.

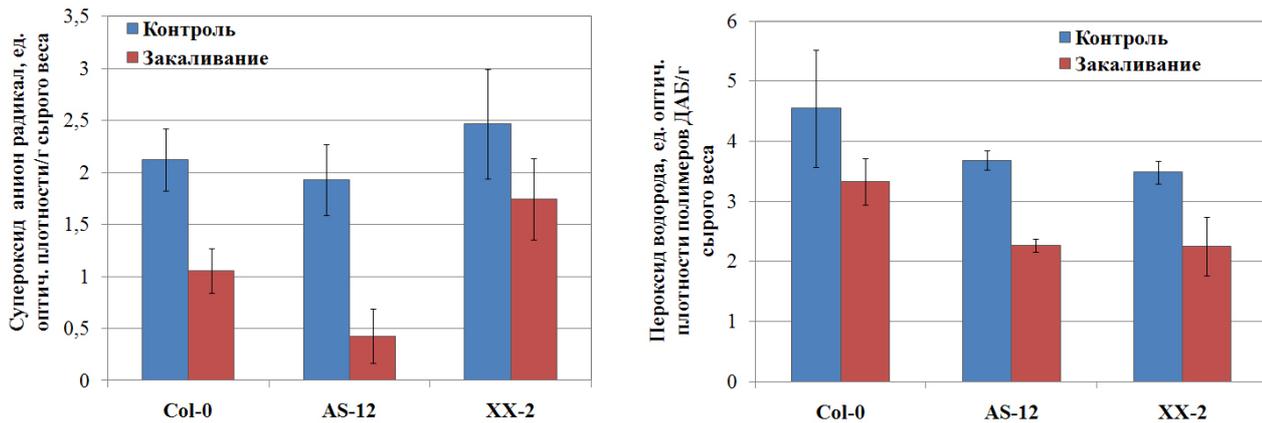


Figure 5. Содержание супероксид анион-радикала и пероксида водорода в листьях растений арабидопсиса дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a* в контрольных условиях и после закаливания в течение 7 суток при 5 °С.

Обозначения: как на Fig. 1.

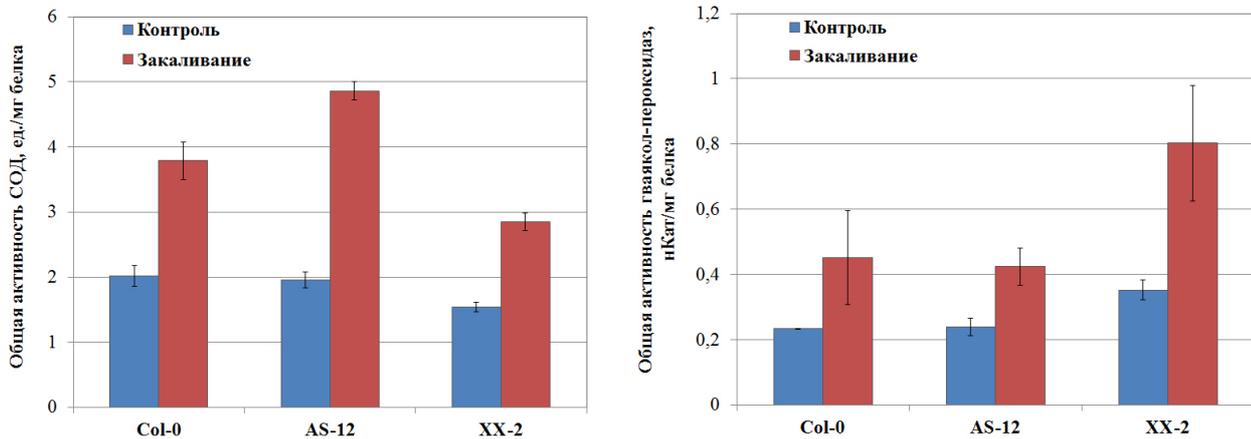


Figure 6. Общая активность супероксиддисмутазы и гваяколовых пероксидаз в листьях растений арабидопсиса дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a* в контрольных условиях и после закаливания в течение 7 суток при 5 °С.

Обозначения: как на Fig. 1.

Таким образом, нами обнаружены различия в базовой морозоустойчивости растений арабидопсиса с измененной экспрессией гена *AOX1a*, однако не выявлено существенных различий в морозоустойчивости закаленных растений дикого типа и линий с измененной экспрессией *AOX1a*. Можно заключить, что функционирование альтернативной оксидазы играет важную роль в формировании морозоустойчивого состояния растений, однако снижение активности данного фермента, связанное со снижением экспрессии

кодирующих его генов (в частности *AOX1a*), может приводить к активации других механизмов, которые вносят вклад в защиту растений при низкотемпературном стрессе.

ACKNOWLEDGEMENTS

Авторы признательны Тарасенко В.И. за предоставленные семена арабидопсиса линий AS-12 и XX-2. В работе использовалось оборудование ЦКП ИНЦ СО РАН «Байкальский аналитический центр» и ЦКП СИФИБР СО РАН

«Фитотрон». Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №15-04-06533-а и №16-34-00105-мол_а.

REFERENCES

- Aleksandrov V.Ja. (1954) Uproshhennyj sposob infil'tracii rastitel'nyh tkanej. *Botanicheskij zhurnal* [In Russian], **39**, 421-422.
- Beauchamp C. and Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287.
- Bergmeyer H.U. (1983) Methods of enzymatic analysis. Volume 1: Fundamentals, VCH Publishers, Weinheim, 571 p.
- Blokhina O.B. and Fagerstedt K.V. (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Plant Physiol.*, **138**, 447-462.
- Borecky J., Nogueira F.T.S., de Oliveira K.A.P., Maia I.G., Vercesi A.E. and Arruda P. (2006) 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.*, **57**, 849-864.
- Borovik O.A. (2015) Funkcionirovanie al'ternativnoj oksidazy i NAD(F)-N-degidrogenaz II tipa v mitohondriyah iz ehtiolirovannyh i zelenyh pobegov ozimoj pshenicy pri holodovom zakalivanii: avtoref. dis... kand. biol. nauk : 03.01.05, Irkutsk, 22 s.
- Borovik O.A., Grabelnych O.I., Koroleva N.A., Pobezhimova T.P. and Voinikov V.K. (2013) The relationships among an activity of the alternative pathway respiratory flux, a content of carbohydrates and a frost-resistance of winter wheat. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **9**, 241-250.
- Clifton R., Millar A.H. and Whelan J. (2006) 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*, **1757**, 730-741.
- Considine M.J., Holtzapffel R.C. and Day D.A., Whelan J. and Millar A.H. (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.*, **129**, 949-953.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G. and Amrani A.E. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, **57**, 449-459.
- Dishe Z. (1967) Obsshie cvetnye reakcii. pod red. Kochetkova N.K. Metodi himii uglevodov. M: Mir [In Russian], 21-24.
- Fiorani F., Umbach A.L. and Siedow J.N. (2005) 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.*, **139**, 1795-1805.
- Grabelnych O.I., Kolesnichenko A.V., Pobezhimova T.P., Tourchaninova V.V., Korzun A.M., Koroleva N.A., Zykova V.V. and Voinikov V.K. (2003) The role of different plant seedling shoots mitochondrial uncoupling systems in thermogenesis during low-temperature stress. *J. Thermal Biol.*, **28**, 571-580.
- Grabel'nyh O.I., Pobezhimova T.P., Pavlovskaja N.S., Koroleva N.A., Borovik O.A., Ljubushkina I.V., Vojnikov V.K. (2011) Antioksidantnaja funkcija al'ternativnoj oksidazy v mitohondriyah ozimoj pshenicy pri holodovom zakalivanii. *Biologicheskie membrany* [In Russian], **28**,

- 274-283.
- Grabelnych 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. and Voinikov V.K. (2014) Mitochondrial energy dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings. *Biochem. (Moscow)*, **79**, 506-519.
- Lambers H., Robinson A. and Ribas-Carbo M. (2005) Regulation of respiration *in vivo*. *Plant Respiration: From Cell to Ecosystem*. Lambers H. and Ribas-Carbo M. (eds.), Springer, Hamburg, pp.1-15.
- Maxwell D.P., Wang Y. and McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 8271-8276.
- Meeuse B.J.D. (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 117-126.
- Michalecka A.M., Svensson A.S., Johansson F.I., Agius S.C., Johanson U., Brennicke A., Binder S. and Rasmusson A.G. (2003) Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.*, **133**, 642-652.
- Nagy K.A., Odell D.K. and Seymour R.S. (1972) Temperature regulation by the inflorescence of *Philodendron*. *Science*, **178**, 1195-1197.
- Popov V.N. (2003) Possible role of free oxidation processes in regulation of reactive oxygen species production in plant mitochondria (review). *Biochem. Soc. Transactions*, **31**, 1316-1317.
- Purvis A.C. and Shewfelt R.L. (1993) Does the alternative pathway ameliorates chilling injury in sensitive plant tissue? *Physiol. Plant.*, **88**, 712-718.
- Seymour R.A. and Schultze-Motel P. (1999) Respiration, temperature regulation and energetics of thermogenic inflorescences of the dragon lily *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, **266**, 1975-1983.
- Sugie A., Naydenov N., Mizuno N., Nakamura C. and Takumi S. (2006) 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.*, **81**, 349-354.
- Tarasenko V.I., Garnik E.Y., Shmakov V.N. and Konstantinov Y.M. (2012) Modified alternative oxidase expression results in different reactive oxygen species content in *Arabidopsis* cell culture but not in whole plants. *Biologia Plant.*, **56**, 635-640.
- Trunova T.I. (2007) Rastenie i nizkotemperaturnyj stress. M.: Nauka [in Russian], 54 s.
- Umbach A.L., Fiorani F. and Siedow J.N. (2005) Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol.*, **139**, 1806-1820.
- Vanlerberghe G.C. (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. Mol. Sci.*, **14**, 6805-6847.
- Vanlerberghe G.C., Vanlerberghe A.E. and McIntosh L. (1994) Molecular genetic alteration of plant respiration: silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **106**, 1503-1510.

- Wagner A.M., Krab K., Wagner M.J. and Moore A.L. (2008) Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: The role of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 993-1000.
- Wang J., Rajakulendran N., Amirsadeghi S. and Vanlerberghe C. (2011) Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiol. Plant.*, **142**, 339-351.
- Watanabe C.K., Hachiya T., Terashima I. and Noguchi K. (2008) 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 Environ.*, **31**, 1190-1202.
- Zhang D.-W., Xu F., Zhang Z.-W., Chen Y.-E., Du J.-B., Jia S.-D., Yuan S. and Lin H.-H. (2010) Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Environ.*, **33**, 2121-2131.
- Zhu Y., Lu J., Wang J., Chen F., Leng F. and Li H. (2011) Regulation of thermogenesis in plants: The interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *J. Integr. Plant Biol.*, **53**, 7-13.
- Suzuki N. and Mittler R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.*, **126**, 45-51.
- Xu J., Li Y., Sun J., Du L., Zhang Y., Yu Q. and Liu X. (2013) Comparative physiological and proteomic response to abrupt low temperature stress between two winter wheat cultivars differing in low temperature tolerance. *Plant Biol.*, **15**, 292-303.