

DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-185-201

УДК 581.1:581.19

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* С ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *NDB2*

*И.В. Федосеева, А.И. Катышев, А.В. Федяева,  
А.В. Степанов, Г.Б. Боровский*

**Обоснование.** Альтернативный путь дыхания митохондрий растений не связан с синтезом АТФ и, следовательно, не контролируется непосредственно энергетическим статусом клетки. Альтернативный дыхательный путь включает в себя ротенон нечувствительные *NAD(P)H* дегидрогеназы II типа, расположенные как на внешней, так и на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий, убихинон и альтернативную оксидазу (АОХ). Предполагается, что альтернативные *NAD(P)H* дегидрогеназы имеют функции, сходные с функциями АОХ, среди которых термогенез, предотвращение образования АФК, окисление избытка восстановителей для продолжения метаболических путей и др. Публикаций об успешном подавлении экспрессии *NDB2* пока недостаточно. Например, показано, что растения арабидопсиса, лишённые и *АОХ1а* и *NDB2* были более чувствительны к комбинированной засухе и повышенному освещению, в то время как растения, гиперэкспрессирующие эти гены, демонстрировали повышенную устойчивость и способность к постстрессовому восстановлению.

**Цель.** Целью данной работы являлось изучить, как подавление экспрессии *NDB2* в гетеротрофных клетках суспензионной культуры арабидопсиса повлияет на экспрессию других генов альтернативного пути дыхания, разобщающих белков, а также генов белков теплового шока в не стрессовых условиях.

**Материалы и методы.** Для выделения РНК отбирали по 5 мл клеток суспензионных культур. РНК выделяли с помощью реактивов из набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Литва), согласно инструкции производителя.

Синтез первой цепи кДНК осуществляли с использованием набора реактивов Thermo Scientific (Литва), согласно рекомендациям фирмы производителя.

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).

Все эксперименты проводились в двух аналитических и трех биологических повторностях. В качестве референсного гена использовали ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу – GAPD.

**Результаты.** Количество мРНК гена *NDB2* в клетках суспензионной культуры линии *AS5* было снижено в 8,2 раза по сравнению с контролем *Col-0*. Подавление экспрессии гена *NDB2* в клетках суспензионной культуры *арабидопсиса* линии *AS5* приводило к увеличению количества транскриптов не только гена *NDB4*, но и *NDB1*, а также *NDA2* и *NDC1*; в то же время экспрессия генов *NDB3* и *NDA1* снижалась по сравнению с клетками *Col-0*. Мы не обнаружили изменения уровней экспрессии генов *AOX1a*, *AOX1b* и *AOX1d* в клетках линии *AS5* по сравнению с контролем, однако количество транскриптов гена *AOX1c* несколько увеличивалось. При анализе уровней экспрессии генов, кодирующих разобщающие белки, было обнаружено увеличение экспрессии гена *UCP1* в клетках линии *AS5*. В клетках суспензионной культуры линии *AS5* повышались уровни экспрессии всех исследуемых нами генов БТШ, кроме *HSP17.7*.

**Заключение.** Таким образом, полученные результаты предполагают, что подавление экспрессии гена *NDB2* в гетеротрофных клетках *арабидопсиса* в отсутствие стресса изменяет редокс-статус клетки, что, в свою очередь, приводит к изменениям уровней накопления транскриптов других генов *NAD(P)H* дегидрогеназ и увеличению экспрессии генов БТШ, при этом экспрессия ключевых генов *AOX* не изменяется.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana* (экотип *Columbia*); *NAD(P)H* дегидрогеназы II типа; экспрессия генов

**Для цитирования.** Федосеева И.В., Катышев А.И., Федяева А.В., Степанов А.В., Боровский Г.Б. Анализ экспрессии генов в клетках суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* с пониженной экспрессией гена *NDB2* // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2021. Т. 13, № 2. С. 185-201. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-185-201

## ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* SUSPENSION CULTURE CELLS WITH REDUCED *NDB2* GENE EXPRESSION

*I.V. Fedoseeva, A.I. Katyshev, A.V. Fedyaeva,  
A.V. Stepanov, G.B. Borovskii*

**Background.** The alternative respiratory pathway of plant mitochondria is not linked to ATP synthesis and, therefore, is not directly controlled by the energy status of the cell. This alternative pathway includes rotenone insensitive *NAD(P)H* type

*II dehydrogenases located on both the outer and inner surfaces of the inner mitochondrial membrane, ubiquinone, and alternative oxidase (AOX). It is supposed that alternative NAD(P)H dehydrogenases have functions similar to those of AOX, including thermogenesis, prevention of ROS formation, oxidation of overage reducing agents for the metabolic pathways maintenance, etc. Publications on the successful NDB2 suppression expression are still insufficient. For example, Arabidopsis plants lacking both AOX1a and NDB2 were shown to be more sensitive to combined drought and high light treatment, while plants overexpressing these genes showed increased tolerance and ability to post-stress recovery.*

**Purpose.** *The aim of this work was to study how the suppression of NDB2 expression in the heterotrophic cells of Arabidopsis suspension culture will affect the expression of other alternative respiratory pathway genes, uncoupling proteins, as well as genes of heat shock proteins under non-stress conditions.*

**Materials and methods.** *For RNA isolation, 5 ml of suspension culture cells were collected. RNA was isolated using reagents from the GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Lithuania) according to the manufacturer's instructions.*

*The first strand of cDNA was synthesized using the Thermo Scientific reagent kit (Lithuania), according to the manufacturer's recommendations. RT-PCR was carried out on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, the USA), using a qPCR mix-HS SYBR reagent kit (Evrogen, Russia) according to the manufacturer's instructions. The analysis of RT-PCR data was performed using the SFX Manager software (Bio-Rad, USA). All experiments were carried out in two analytical and three biological replicates. A gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPD, was used as a reference gene.*

**Results.** *The amount of NDB2 mRNA in the AS5 suspension culture cells was reduced by 8.2 times compared to the control, Col-0. Suppression of the NDB2 expression in AS5 Arabidopsis suspension culture cells resulted in an increase of transcripts amount not only NDB4 gene, but also NDB1, as well as NDA2 and NDC1; at the same time, the NDB3 and NDA1 expression genes decreased in comparison with Col-0 cells. We did not find any changes in the AOX1a, AOX1b, and AOX1d expression levels genes in AS5 cells compared to the control, but the quantity of AOX1c gene transcripts increased slightly. During analyzing the expression levels of the genes encoding the uncoupling proteins, UCP1 gene expression was increased in AS5 cells. In the cells of the AS5 line suspension culture, the expression levels of all the HSPs genes studied by us, except for HSP17.7, increased.*

**Conclusion.** *Therefore, the results obtained suggest that the suppression of NDB2 gene expression in Arabidopsis heterotrophic cells in the absence of stress alters redox status of cells, which in turn leads to changes in the level of accumulation of*

*other NAD(P)H dehydrogenases genes transcripts and the increase of HSPs gene expression, while the key AOX genes expression does not change.*

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia); type II NAD(P)H dehydrogenases; genes expression

**For citation.** Fedoseeva I.V., Katyshev A.I., Fedyayeva A.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B. Analysis of gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension culture cells with reduced NDB2 gene expression. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 185-201. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-185-201

## Введение

Альтернативный путь дыхания митохондрий растений не связан с синтезом АТФ и, следовательно, не контролируется непосредственно энергетическим статусом клетки [14]. В классической электрон-транспортной цепи окисление митохондриального NADH происходит через ротенон чувствительный комплекс I и цитохром *c* оксидазу, одновременно генерируя протонный градиент и приводя к синтезу АТФ через АТФ синтазу. Альтернативный дыхательный путь включает в себя ротенон нечувствительные NAD(P)H дегидрогеназы II типа, расположенные как на внешней, так и на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий, убихинон и альтернативную оксидазу (АОХ) [12, 16, 23]. Альтернативный путь присутствует во всех исследованных на сегодняшний день высших растениях. У многих растений экспрессия компонентов альтернативного пути увеличивается при воздействии химических или экологических стрессов [5, 16, 17, 23]. В арабидопсисе (*Arabidopsis thaliana*) найдены семь генов NAD(P)H дегидрогеназ II типа (ND II) [13] (*NDB1–4*, *NDA1–2* и *NDC1*) и пять генов АОХ (*AOX1a–d* и *AOX2*) [15]. NDB 1–4 локализованы на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, в то время как NDA 1 и 2, а также NDC1 были определены как внутренние (обращены к митохондриальному матриксу) [10].

Разобщающие белки (UCPs) образуют подсемейство в семействе митохондриальных белков-носителей и катализируют жирнокислотную рециркуляцию протонов, тем самым модулируя степень связи между митохондриальным переносом электронов и синтезом АТФ [20]. UCP действуют только в присутствии АФК, по-видимому, контролируя и модулируя окислительно-восстановительный статус цепи переноса электронов [7, 9, 20].

Предполагается, что альтернативные NAD(P)H дегидрогеназы имеют функции, сходные с функциями АОХ, среди которых термогенез, предотвращение образования АФК, окисление избытка восстановителей для

поддержания работы метаболических путей и др. [16]. Продукция митохондриальных АФК увеличивается под воздействием внешних стимулов и может активировать запуск либо защитных механизмов (например, белков теплового шока, БТШ), либо приводить к гибели [4]. 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 [3]. Показано, что делеция гена *NDB4*, кодирующего внешнюю NADH дегидрогеназу *A. thaliana*, приводила к снижению уровня генерации АФК [21]. Другие авторы [24, 25] показали, что снижение количества белков NDA1 и NDA2 в результате подавления экспрессии соответствующих генов приводило к замедлению роста и повышению уровня лактата. Снижение количества белка NDB1 нарушало рост растений, но никак 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 [25]. Растения нокаут-мутантов арабидопсиса по гену *NDC1*, кодирующего фермент, участвующий в синтезе витамина К в хлоропластах, были очень чувствительны к свету [11]. В растениях арабидопсиса, у которых с помощью РНК интерференции был уменьшен синтез NDB4, значительно увеличивался синтез NDB2 и AOX1a, что привело к уменьшению образования АФК клетками, увеличению солеустойчивости, а также некоторым изменениям в скорости развития и фенотипе растений [21]. Публикаций об успешном подавлении экспрессии *NDB2* пока недостаточно. В одной из работ показано, что растения арабидопсиса, лишённые и *AOX1a* и *NDB2* были более чувствительны к комбинированной засухе и повышенному освещению, в то время как растения, гиперэкспрессирующие эти гены, демонстрировали повышенную устойчивость и способность к постстрессовому восстановлению [22]. Поэтому целью данной работы являлось изучить, как подавление экспрессии *NDB2* в гетеротрофных клетках суспензионной культуры арабидопсиса повлияет на экспрессию других генов альтернативного пути дыхания, разобщающих белков, а также генов белков теплового шока в не стрессовых условиях.

### Материалы и методы

Для получения растений со сниженной экспрессией гена *NDB2* арабидопсиса *A. thaliana* (экотип Columbia, Col-0) кДНК, соответствующая транскрибируемой последовательности мРНК этого гена клонировали в антисмысловой ориентации в составе плазмиды pBI121 под контролем 35S

промотора [2] в клетках *Agrobacterium tumefaciens*, штамм C58c1. Агробактериальную трансформацию растений арабидопсиса генетической конструкцией проводили методом окунания цветков [6]. Полученные трансгенные растения отбирали с помощью селекции на канамицине (50 мкг/мл), наличие встройки целевого гена подтверждали с помощью ПЦР.

Суспензионные культуры клеток Col-0 и линии со сниженной экспрессией гена *NDB2* получали и культивировали, как описано ранее [19].

Для выделения РНК отбирали по 5 мл клеток суспензионных культур. РНК выделяли с помощью реактивов из набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Литва), согласно инструкции производителя.

Синтез первой цепи кДНК осуществляли с использованием набора реактивов Thermo Scientific (Литва), согласно рекомендациям фирмы производителя.

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, США). Все эксперименты проводились в двух аналитических и трех биологических повторностях. В качестве референсного гена использовали ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу – *GAPD* [8].

Последовательности использованных в работе олигонуклеотидов приведены в Таблице.

Таблица

**Олигонуклеотиды, использованные в экспериментах по определению уровней экспрессии генов *A. thaliana* с помощью ПЦР в реальном времени**

Наименование олигонуклеотида	Последовательность, 5'→3'
17.6A-RTL	CTTGACTTTGTGTGTGTGTCTCTGA
17.6A-RTR	CCAAATACACACATTTCTCCACCATA
17.6B-RTL	TTTATCATCGGAGTTGCTTGTGTTT
17.6B-RTR	CATCATAATTCATAGCTCAATCGGAGA
17.6C-RTL	GGTAGTGAAATAATTGGTGTGTGATGTGT
17.6C-RTR	CAAAACAATCCGAGAGGCAGAAGTAT
17.6II-RTL	GTTTTGTGATTGTGTGTTGGATTTATCT
17.6II-RTR	CATCTTAGAACAAAACACCATATCCCT
17.7-RTL	TTCTCTGTTCCATAATTTGTCTTTGTGTTC
17.7-RTR	GCATGGATGGTTCAAGAGAGCAA

Окончание табл.

Hsp101-RTL	TCTCCTCCACCTGATGATATTCCA
Hsp101-RTR	CTTGAGCACGACGAATGACCTTA
GAPD RTL	GGCGAGAGTTTTGTGTGTGGTTGA
GAPD RTR	AAGCAGGGAAAACATTAAGAGAAAAGCAA
Ndb2 RTL	CTCCAAGGCTCCAATACACATATCTCTC
Ndb2 RTR	ATCTCTCCTCGTTACTTGTGGTCATTATTT
Ndb3 RTL	TCAGGAACACTGACAAATGAAAGAATTT
Ndb3 RTR	GTTTCGACAGACTTGTGGGAACCAATT
Ndb4 RTL	AAGACAGGTTCAATGGTTGTGGGA
Ndb4 RTR	GCCAGTTTCTCTTTCCTTTGTGGAT
Aox1a RTL	CGGCTGGACCACGTTTGTCT
Aox1a RTR	CCAATCGTCGGAGCTCTAGTCCATA
Aox1b RTL	AATGATGATGAGTCGTCGCTATGGA
Aox1b RTR	CCGCTAGATCCTTTCTCCTCCGTA
Aox1c RTL	CACTACATTACTCCGTCGCTCTCTCT
Aox1c RTR	TTTCGCTGGAGCAAGTTGGTGA, 22-mer
Aox1d RTL	GACATCTCATTAGCACTTGCCCA
Aox1d RTR	TTCCCACTTACCGGAGATGACGT
Ndb1 RTL	TGCCTGCAACTGCTCAGGTC
Ndb1 RTR	GATGCCCGCCAGTTCTGAAG
Nda1 RTL	ATCCTACACTCTCTCGTCCCCTTCT
Nda1 RTR	CTCCAACGCATTAACATACCTCCTT
Nda2 RTL	CACACACACAACGAAGAAGACGAAGA
Nda2 RTR	CGAGAAGCGAGAGTGTATGATAATGATGA
Ndc1 RTL	CCGTTCTCTCCTCTGTATCTTCTCTCA
Ndc1 RTR	GCCACTGTTGTTTGTCACTGCTCT
Ucp1 RTL	GCAGAGAGAGAGAGAGAGGGACGAT
Ucp1 RTR	GGGACGACGACGATTACGGCTA
Ucp2 RTL	CATCAATCATCATCGCTGTTAGAGAGAA
Ucp2 RTR	GCGAAATCTGGAGAAGCACCGA
Ucp3 RTL	GAGCCGAGTGACCAGAGAAGCA
Ucp3 RTR	GGAAACGTAACCTGACTCTGCAACCAT

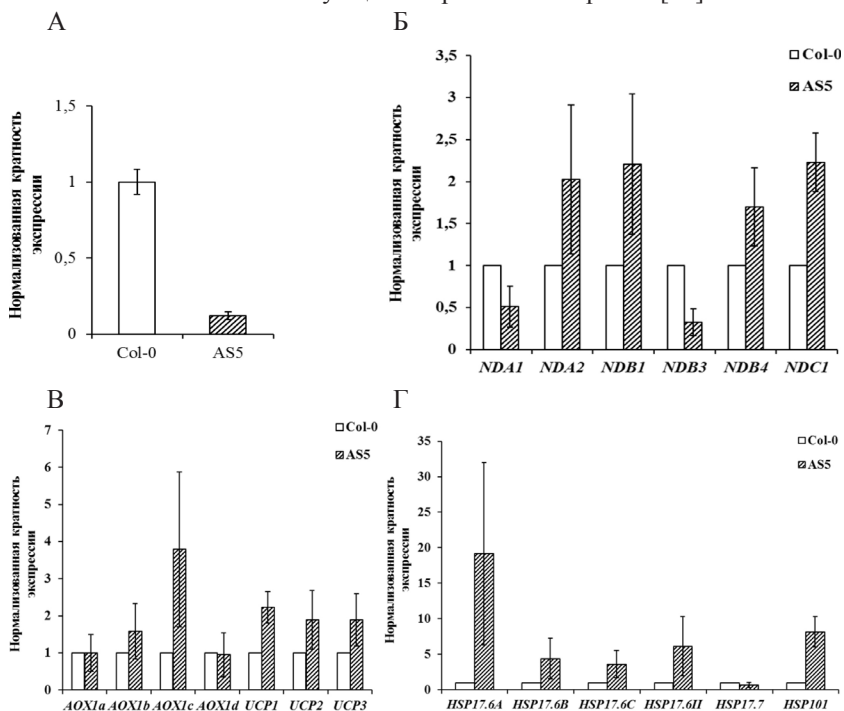
### Результаты исследований и их обсуждение

Количество мРНК гена *NDB2* в клетках суспензионной культуры линии AS5 было снижено в 8,2 раза по сравнению с контролем, Col-0 (рисунок, А).

Показано, что митохондрии, выделенные из зелёных листьев арабидопсиса линии *Atndb2* со сниженной экспрессией гена *NDB2*, резко снижали скорость окисления экзогенного NADH [22]. Авторы предположили, что небольшое количество окислительной активности NADH, оставшееся в растениях *Atndb2*, вероятно, связано с другими внешними NADH деги-

дрогеназами, скорее всего, с *NDB4*. В наших экспериментах подавление экспрессии гена *NDB2* в клетках суспензионной культуры арабидопсиса линии AS5 приводило к увеличению количества транскриптов не только гена *NDB4*, но и *NDB1*, а также *NDA2* и *NDC1*; в то же время экспрессия генов *NDB3* и *NDA1* снижалась по сравнению с клетками Col-0 (рисунок, Б).

Мы не обнаружили изменения уровней экспрессии генов *AOX1a*, *AOX1b* и *AOX1d* в клетках линии AS5 по сравнению с контролем, однако количество транскриптов гена *AOX1c* несколько увеличивалось (рисунок, В). При анализе уровней экспрессии генов, кодирующих разобщающие белки, было обнаружено увеличение экспрессии гена *UCP1* в клетках линии AS5 (рисунок, В). Разобщающие белки действуют только в присутствии АФК, вероятно, при этом контролируя и модулируя окислительно-восстановительный статус цепи переноса электронов [20].



**Рис.** Сравнительный анализ количества мРНК различных генов в контрольных (Col-0) и трансгенных (AS5) клетках суспензионных культур арабидопсиса. n=3, m±S.E



Продукция АФК рассматривается как вероятный триггер синтеза БТШ, а митохондрии могут быть её основным источником [1]. В клетках суспензионной культуры линии AS5 повышались уровни экспрессии всех исследуемых нами генов БТШ, кроме *HSP17.7* (рисунок, Г).

Таким образом, полученные результаты предполагают, что подавление экспрессии гена *NDB2* в гетеротрофных клетках арабидопсиса в отсутствие стресса изменяет редокс-статус клетки, что, в свою очередь, приводит к изменениям уровней накопления транскриптов других генов НАДН-дегидрогеназ и увеличению экспрессии генов БТШ, при этом экспрессия ключевых генов *AOX* не изменяется.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests information.** We have no conflict of interest to declare.

**Благодарности.** Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» и коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН.

**Acknowledgments.** This research was done using the equipment of The Core Facilities Center “Bioanalitika” and the collections of The Core Facilities Center “Bioresource Center” at the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia).

### Список литературы

1. Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. 2014. Т. 61, № 2. С. 155-169. <https://doi.org/10.1134/S1021443714020125>
2. Шишлова-Соколовская А.М., Урбанович О.Ю., Федосеева И.В., Боровский Г.Б. Трансформация *Nicotiana tabacum* конструкцией, несущей ген *NDB2* из *Arabidopsis thaliana* в антисмысловой ориентации // Молекулярная и прикладная генетика. 2017. Т. 22. С. 76-83.
3. Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress // Physiologia Plantarum, 2007, vol. 129, no. 1, pp. 253-266. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00775.x>
4. Brand M.D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling // Free Radic. Biol. Med., 2016, vol. 100, pp. 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>

5. 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 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*, 2006, vol. 1757, no. 7, pp. 730-741. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.009>
6. Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.*, 1998, vol. 16, no. 6, pp. 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x>
7. Considine M.J., Goodman M., Echtay K.S., Laloi M., Whelan J., Brand M.D., Sweetlove L.J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein // *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 25, pp. 22298-22302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301075200>
8. Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., Scheible W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis // *Plant Physiology*, 2005, vol. 139, no. 1, pp. 5-17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
9. Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roeback S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins // *Nature*, 2002, vol. 415, pp. 96-99. <https://doi.org/10.1038/415096a>
10. 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: intraorganelle location and expression // *Plant Cell Physiology*, 2006, vol. 47, no. 1, pp. 43-54. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci221>
11. Fatihi A., Latimer S., Schmollinger S., Block A., Dussault P.H., Vermaas W.F.J., Merchant S.S., Basset G.J. A dedicated type II NADPH dehydrogenase performs the penultimate step in the biosynthesis of vitamin K1 in *Synechocystis* and Arabidopsis // *Plant Cell*, 2015, vol. 27, no. 6, pp. 1730-1741. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00103>
12. Finnegan P.M., Soole K.L., Umbach A.L. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants / Eds.: Day D.A., Millar H., Whelan J. // *Plant mitochondria: from genome to function*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 163-230.
13. 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, vol. 133, no. 2, pp. 642-652. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024208>

14. Millar A.H., Whelan J., Soole K.L., Day D.A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants / Eds.: Merchant S.S., Briggs W.R., Ort D. // Annual Review of Plant Biology, 2011, vol. 62, pp. 79-104. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103857>
15. Polidoros A.N., Mylona P.V., Arnholdt-Schmitt B. Aox gene structure, transcript variation and expression in plants // Physiol. Plant., 2009, vol. 137, no. 4, pp. 342-353. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01284.x>
16. Rasmusson A.G., Soole K.L., Elthon T.E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria // Annu. Rev. Plant Biol., 2004, vol. 55, pp. 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141720>
17. Rasmusson A.G., Moller I.M. Mitochondrial electron transport and plant stress // Plant Mitochondria; Ed.: Kempken F. NY: Springer, New York, 2011, pp. 357-381.
18. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction // Curr. Opin. Cell Biol., 2015, vol. 33, pp. 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>
19. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // Plant J., 2007, vol. 52, no. 4, pp. 763-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03275.x>
20. Smith A.M., Ratcliffe R.G., Sweetlove L.J. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants // J. Biol. Chem., 2004, vol. 279, no. 50, pp. 51944-51952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408920200>
21. Smith C., Barthet 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, vol. 52, no. 7, pp. 1222-1237. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr073>
22. 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 Physiology, 2019, vol. 181, no. 2, pp. 774-788. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00877>
23. Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // Int. J. Mol. Sci., 2013, vol. 14, no. 4, pp. 6805-6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
24. Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Araújo W.L., Aidemark M., Fernán-dez-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.*, 2014a, vol. 7, no. 2, pp. 356-368. <https://doi.org/10.1093/mp/sst115>
25. 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, vol. 55, no. 5, pp. 881-896. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu021>

### References

1. Rikhvanov E.G., Fedoseeva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Borovskiy G.B., Voynikov V.K. *Fiziologiya rasteniy*, 2014, vol. 61, no. 2, pp. 155-169. <https://doi.org/10.1134/S1021443714020125>
2. Shishlova-Sokolovskaya A.M., Urbanovich O.Yu., Fedoseeva I.V., Borovskiy G.B. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*, 2017, vol. 22, pp. 76-83.
3. Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiologia Plantarum*, 2007, vol. 129, no. 1, pp. 253-266. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00775.x>
4. Brand M.D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 100, pp. 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
5. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Bioenergetics*, 2006, vol. 1757, no. 7, pp. 730-741. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.009>
6. Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 1998, vol. 16, no. 6, pp. 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x>
7. Considine M.J., Goodman M., Echtay K.S., Laloi M., Whelan J., Brand M.D., Sweetlove L.J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 25, pp. 22298-22302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301075200>
8. Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., Scheible W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2005, vol. 139, no. 1, pp. 5-17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>

9. Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 2002, vol. 415, pp. 96-99. <https://doi.org/10.1038/415096a>
10. 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: intraorganelle location and expression. *Plant Cell Physiology*, 2006, vol. 47, no. 1, pp. 43-54. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci221>
11. Fatihi A., Latimer S., Schmollinger S., Block A., Dussault P.H., Vermaas W.F.J., Merchant S.S., Basset G.J. A dedicated type II NADPH dehydrogenase performs the penultimate step in the biosynthesis of vitamin K1 in *Synechocystis* and Arabidopsis. *Plant Cell*, 2015, vol. 27, no. 6, pp. 1730-1741. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00103>
12. Finnegan P.M., Soole K.L., Umbach A.L. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants / Eds.: Day D.A., Millar H., Whelan J. *Plant mitochondria: from genome to function*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 163-230.
13. 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, vol. 133, no. 2, pp. 642-652. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024208>
14. Millar A.H., Whelan J., Soole K.L., Day D.A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants / Eds.: Merchant S.S., Briggs W.R., Ort D. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, vol. 62, pp. 79-104. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103857>
15. Polidoros A.N., Mylona P.V., Arnholdt-Schmitt B. Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiol. Plant.*, 2009, vol. 137, no. 4, pp. 342-353. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01284.x>
16. Rasmusson A.G., Soole K.L., Elthon T.E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, vol. 55, pp. 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141720>
17. Rasmusson A.G., Moller I.M. Mitochondrial electron transport and plant stress. *Plant Mitochondria*; Ed.: Kempken F. NY: Springer, New York, 2011, pp. 357-381.
18. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2015, vol. 33, pp. 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2014.09.010>
19. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nucle-

- ar-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture. *Plant J.*, 2007, vol. 52, no. 4, pp. 763-778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03275.x>
20. Smith A.M., Ratcliffe R.G., Sweetlove L.J. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 50, pp. 51944-51952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408920200>
  21. 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, vol. 52, no. 7, pp. 1222-1237. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr073>
  22. 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 Physiology*, 2019, vol. 181, no. 2, pp. 774-788. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00877>
  23. Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 4, pp. 6805-6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
  24. Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Araújo W.L., Aidemark M., Fernán-dez-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.*, 2014a, vol. 7, no. 2, pp. 356-368. <https://doi.org/10.1093/mp/sst115>
  25. 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, vol. 55, no. 5, pp. 881-896. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu021>

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Федосеева И.В.:** выделение РНК и синтез кДНК; планирование и проведение экспериментов методом ПЦР-РВ, написание рукописи.

**Катышев А.И.:** агробактериальная трансформация растений арабидопсиса; подбор последовательностей олигонуклеотидов; обсуждение и анализ полученных результатов.

**Федяева А.В.:** селекция трансгенных растений, сбор и размножение семенного материала.

**Степанов А.В.:** получение и культивирование клеток суспензионных культур.

**Боровский Г.Б.:** планирование экспериментов, обсуждение и анализ полученных результатов.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

**Irina V. Fedoseeva:** RNA isolation and cDNA synthesis; designed and performed the experiments by the RT-PCR method and wrote the manuscript.

**Alexander I. Katsyhev:** agrobacterial transformation of *Arabidopsis* plants; selection of oligonucleotide sequences; discussed and analysis of the results obtained.

**Anna V. Fedyaeva:** selection of transgenic plants, collection and propagation of seed material.

**Alexey V. Stepanov:** preparation and cultivation of suspension culture cells;

**Gennadii B. Borovskii:** planning of experiments, discussed and analysis of the results obtained.

#### **ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ**

**Федосеева Ирина Владимировна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН)*  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
*fedoseeva.irina2009@yandex.ru*

**Катышев Александр Игоревич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики *Федеральное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук*  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
*byasky78@mail.ru*

**Федяева Анна Валерьевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологической генетики *Федеральное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук*

*ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
fedyaeva.anna@mail.ru*

**Степанов Алексей Владимирович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики *Федеральное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук*  
*ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
saw33@list.ru*

**Боровский Геннадий Борисович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории физиологической генетики *Федеральное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук*  
*ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
borovskii@sifibr.irk.ru*

#### **DATA ABOUT THE AUTHORS**

**Irina V. Fedoseeva**, Ph.D., Senior Researcher of the Laboratory of Physiological Genetics

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation  
fedoseeva.irina2009@yandex.ru  
ORCID: 0000-0001-6529-9304  
ResearcherID: J-4468-2018  
Scopus Author ID: 22956847000*

**Alexander I. Katyshev**, Ph.D., Senior Researcher of the Laboratory of Physiological Genetics

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation  
byacky78@mail.ru  
SPIN-code: 7140-4427  
ORCID: 0000-0001-7856-0460  
ResearcherID: F-8419-2016  
Scopus Author ID: 13408667600*



**Anna V. Fedyaeva**, Ph.D., Researcher of the Laboratory of Physiological Genetics

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*fedyaeva.anna@mail.ru*

*SPIN-code: 5521-2563*

*ResearcherID: J-3262-2018*

*Scopus Author ID: 56025492900*

**Alexey V. Stepanov**, Ph.D., Senior Researcher of the Laboratory of Physiological Genetics

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*saw33@list.ru*

*SPIN-code: 3572-8670*

*ORCID: 0000-0002-0456-3690*

*ResearcherID: J-4355-2018*

*Scopus Author ID: 57213473032*

**Gennadii B. Borovskii**, Dr. Sci. (Biology), Principal Research Scientist of the Laboratory of Physiological Genetics

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*borovskii@sifibr.irk.ru*

*SPIN-code: 7462-7535*

*ORCID: 0000-0002-5089-5311*

*ResearcherID: A-5147-2016*

*Scopus Author ID: 7003990731*