

doi 10.18699/vjgb-26-27

Получение и характеристика двойной нокаутной линии *Arabidopsis thaliana*, лишенной экспрессии *AOX1a* и *VTC2*

Е.В. Гармаш , Е.С. Белых , К.В. Ядрихинский , Р.В. Малышев , И.О. Велегжанинов 

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

 garmash@ib.komisc.ru

Аннотация. У высших растений L-галактозный путь является основным путем биосинтеза витамина С (аскорбата, Аск), последний этап которого связан с функционированием электрон-транспортной цепи митохондрий. Помимо основного цитохромного пути, электрон-транспортная цепь растений содержит альтернативный путь через альтернативную терминальную оксидазу (АОХ). Вовлечение АОХ способствует синтезу Аск, поэтому предполагается, что подавление альтернативного пути в условиях дефицита Аск может привести к снижению жизнеспособности растений. В связи с этим была поставлена цель – рассмотреть последствия нокаутирования в растениях *Arabidopsis thaliana* одновременно двух генов: *AOX1a*, наиболее стресс-индуцибельного гена АОХ, и *VTC2*, гена ключевого фермента L-галактозного пути синтеза Аск. Для этого проведено скрещивание двух линий *A. thaliana* с Т-ДНК инсерцией в целевых генах и получены гибридные линии. Изучены характеристики семян первого (F_1) и второго (F_2) поколений. Семена F_1 отличались более крупными размерами по сравнению с родительскими линиями, что могло быть следствием гетерозиса. В поколении F_2 в результате самоопыления растений F_1 сформировались семена, значительно варьирующие по размерам, в том числе группа мелких семян, имеющих дегенеративные морфологические отклонения. Большинство мелких семян не проросло или погибло на стадии появления проростка. Генотипирование этих семян с помощью ПЦР установило отсутствие нормальных копий *AOX1a* и *VTC2* в геноме, что указывает на появление летальной мутации при одновременном нокауте обоих генов. Обсуждаются причины летального исхода двойного нокаута. Одной из генетических причин, по-видимому, стало взаимодействие мутаций (неаллельных генов). На физиологическом уровне, возможно, возникли необратимые нарушения дыхания, в том числе из-за влияния в линии *vtc2* криптической мутации. Для подтверждения данных гипотез требуются дальнейшие исследования. В целом полученные результаты свидетельствуют о жизненно важном совместном функционировании альтернативного и L-галактозного путей биосинтеза Аск и могут быть полезны для развития генно-инженерных приемов управления синтезом витамина С в растениях.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*; альтернативная оксидаза; аскорбат; ГДФ-L-галактозофосфорилаза; линии с нокаутом *AOX1a* и *VTC2*; скрещивание; генотипирование; двойная нокаутная линия; летальная мутация

Для цитирования: Гармаш Е.В., Белых Е.С., Ядрихинский К.В., Малышев Р.В., Велегжанинов И.О. Получение и характеристика двойной нокаутной линии *Arabidopsis thaliana*, лишенной экспрессии *AOX1a* и *VTC2*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(2):241-249. doi 10.18699/vjgb-26-27

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР «Физиологические и молекулярные механизмы интеграции клеточных процессов и целостности растительного организма: фотосинтез и дыхание» (регистрационный номер 125020301262-2).

Благодарности. Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Авторы выражают благодарность научному сотруднику института к.б.н. М.А. Шелякину за помощь при скрещивании линий.

Generation and characterization of a double-knockout *Arabidopsis thaliana* line lacking expression of *AOX1a* and *VTC2*

E.V. Garmash , E.S. Belykh , K.V. Yadrkhinskiy , R.V. Malyshev , I.O. Velegzhaninov 

Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktvykar, Russia

 garmash@ib.komisc.ru

Abstract. In higher plants, the L-galactose pathway is the main pathway for the biosynthesis of vitamin C (ascorbate, Asc), the final step of which is connected with the functioning of the mitochondrial electron transport chain (ETC). In addition to the main cytochrome pathway, plant ETC includes an alternative pathway (AP) via alternative terminal oxidase (AOX). The engagement of AOX promotes Asc synthesis, and it is hypothesized that AOX suppression under conditions of Asc deficiency may reduce plant viability. The aim of this work was to examine the consequences of simultaneously knocking

out two genes in *Arabidopsis thaliana*: *AOX1a*, the most stress-inducible AOX gene, and *VTC2*, encoding a key enzyme of the L-galactose pathway of Asc synthesis. Two lines of *A. thaliana* with T-DNA insertions in the target genes were crossed to generate hybrid lines. Seed characteristics of the first (F₁) and second (F₂) generations were analyzed. F₁ seeds were larger than those of parent lines, possibly due to heterosis. In the F₂ generation, self-pollination of F₁ plants resulted in seeds with significant size variation, including a group of small seeds with degenerative morphological abnormalities. Most of small seeds failed to germinate or died at the seedling stage. PCR genotyping of these seeds revealed the absence of native *AOX1a* and *VTC2* indicating a lethal mutation caused by simultaneous knockout of both genes. One likely genetic cause is the interaction of mutations in non-allelic genes. At the physiological level, irreversible respiratory damage may occur, possibly including the impact of a cryptic mutation in the *vtc2* line. Further studies are necessary to confirm these hypotheses. In general, the results obtained indicate the vital co-functioning of the AP and the L-galactose pathway of Asc biosynthesis and may be useful for the development of genetically engineered techniques for the control of vitamin C synthesis in plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; alternative oxidase; ascorbate; GDP-L-galactose phosphorylase; *AOX1a* and *VTC2* knockout lines; crossing; genotyping; double mutants; lethal mutation

For citation: Garmash E.V., Belykh E.S., Yadrinkhinskiy K.V., Malyshev R.V., Velegzhaninov I.O. Generation and characterization of a double-knockout *Arabidopsis thaliana* line lacking expression of *AOX1a* and *VTC2*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(2):241-249. doi 10.18699/vjgb-26-27

Введение

Аскорбат (витамин С) – важное многофункциональное антиоксидантное соединение, участвующее в обеспечении устойчивости к стрессу и редокс-сигналинге (Smirnov, 2018; Foyer et al., 2020; Matos et al., 2022). В растениях существует несколько путей пополнения его пула – биосинтетические процессы и регенерация аскорбата (Аск) в аскорбат-глутатионовом цикле. Среди всех возможных путей синтеза Аск L-галактозный путь считается доминирующим (Dowdle et al., 2007; Wheeler et al., 2015). В L-галактозном пути ГДФ-Д-манноза последовательно превращается в ГДФ-L-галактозу, L-галактозо-1-фосфат, L-галактозу, L-галактоно-1,4-лактон и, наконец, в L-аскорбат (рис. 1). Ключевой стадией этого пути является реакция, катализируемая ГДФ-L-галактозофосфорилазой (ГДФ) (Yoshimura et al., 2014; Matos et al., 2022). ГДФ кодируется генами-паралогами *VTC2* и *VTC5* (*VITAMIN C*), проявляющими светозависимый характер экспрессии (Yoshimura et al., 2014; Smirnov, 2018). Из них *VTC2* наиболее важен для биосинтеза Аск. Нокаут *VTC2*, в отличие от его паралога *VTC5*, вызывал резкое снижение уровня Аск (на 80 % и более) и роста растений (Dowdle et al., 2007; Lim et al., 2016).

Заключительный этап L-галактозного пути связан с электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) митохондрий, где L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (ГЛДГ) окисляет L-галактоно-1,4-лактон до Аск, передавая электроны на лабильный переносчик электронов между комплексами III и IV – цитохром *c* (см. рис. 1). ЭТЦ растений отличается от ЭТЦ животных по составу переносчиков. Помимо основного энергогенерирующего цитохромного пути (ЦП), цепь содержит альтернативный путь (АП) через альтернативную терминальную цианидустойчивую оксидазу (АОХ) (Гармаш, 2022) (см. рис. 1). АП минует два участка генерации мембранного потенциала (комплексы III и IV) и поэтому является энергетически малоэффективным (Vanlerberghe et al., 2020). Главные функции АП связаны с его участием в поддержании редокс-баланса в ЭТЦ за счет более быстрого окисления НАДН и, тем самым, в предотвращении образования избыточного количества ак-

тивных форм кислорода (АФК). Это влияет на метаболизм не только митохондрий, но и клетки в целом (Del-Saz et al., 2018; Vanlerberghe et al., 2020; Garmash, 2023). Кроме того, АП способствует синтезу Аск, принимая электроны с убихинона и поддерживая пул цитохрома *c* в более окисленном состоянии (Bartoli et al., 2006; Matos et al., 2022).

Исследования мутантных линий с подавлением *VTC2* показали наличие в них многочисленных дефектов и нарушений метаболизма, особенно в стрессовых условиях (Lim et al., 2016; Matos et al., 2022). Полагают, что дефицит аскорбата и фенотип низкорослости мутантных растений могут быть результатом длительного воздействия мутации на дыхательную активность, функционирование ЭТЦ митохондрий и, в частности, транспорта электронов через АОХ (Matos et al., 2022).

Ядерный геном *A. thaliana* содержит пять генов АОХ, среди которых яркую экспрессию в ответ на различные виды стресса проявляет ген *AOX1a* (Del-Saz et al., 2018; Гармаш, 2022). При стрессе (повышенной освещенности) растения *A. thaliana* со сверхэкспрессией *AOX1a* характеризовались усилением синтеза Аск (Garmash et al., 2022; Sweetman et al., 2022), а линии с подавлением *AOX1a* демонстрировали снижение содержания данного метаболита (Vishwakarma et al., 2015; Garmash et al., 2022). При этом у растений *A. thaliana* линии *vtc2* выявлена активация АОХ по сравнению с диким типом, а обработка мутантных растений специфическим ингибитором АП вызывала значительное (на 40 %) снижение концентрации АТФ (Garmash et al., 2024). Другими авторами на основе изучения реакции растений *A. thaliana* с нокаутом гена ГДФ-маннозофосфорилазы, катализирующей образование ГДФ-Д-маннозы (линия *vtc1*), на ингибирование ЭТЦ митохондрий и хлоропластов сделано предположение, что Аск и АОХ могут взаимодополнять друг друга для предотвращения избыточного накопления АФК и обеспечения защиты фотосинтеза от фотоокисления (Talla et al., 2011). Эти данные подтверждают участие АОХ в поддержании синтеза Аск, оптимизации энергетического баланса и указывают на то, что подавление АП в условиях дефицита Аск может привести к снижению жизнеспособности растений.

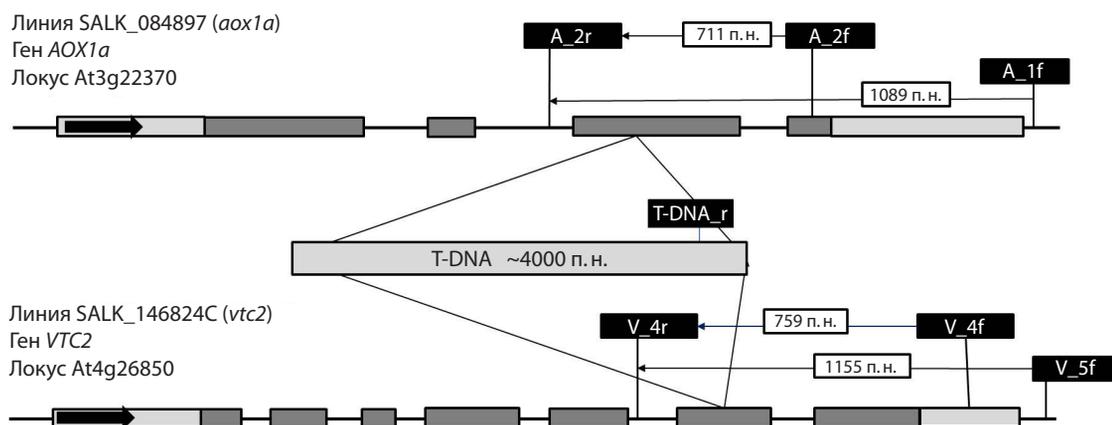


Рис. 2. Схема расположения праймеров и длины ПЦР-продуктов и локализация инсерций в гене *AOX1a* линии SALK_084897 (*aox1a*) и гене *VTC2* линии SALK_146824C (*vtc2*).

Пары праймеров V_4f–V_4r и V_5f–V_4r, а также A_2f–A_2r и A_1f–A_2r позволяют идентифицировать ген линии «дикого типа» *VTC2* или *AOX1a* соответственно, а пары праймеров V_4f–T-DNA_r и V_5f–T-DNA_r, а также A_2f–T-DNA_r и A_1f–T-DNA_r – соответствующий мутантный ген.

Таблица 1. Праймеры для ПЦР в конечной точке, использованные для анализа Т-ДНК вставок в ген *VTC2* (V) в линии SALK_146824C (*vtc2*) и *AOX1a* (A) в линии SALK_084897 (*aox1a*)

Название	Последовательность
T-DNA_r	CTTCCTTTCTCGCCACGTC
V_4f	ACTGAAGGACAAGGCACTCG
V_4r	ACCTTTTACCCTTGCTCATCT
V_5f	TCATAACCAGAGCTTGTGGTGG
A_1f	GATCCACATCCATTGGGTCT
A_2r	CACCTTCGTTAGTGCTTTGGATTCTGG
A_2f	GCTTCCTTTAGTTCACGACCTTGG

SALK_084897 (*aox1a*), контролируя процесс под микроскопом. Для этого на материнском растении нераспустившиеся (за один день до распускания) бутоны аккуратно вскрывали, затем пинцетом тщательно удаляли все тычинки с пылью. Со второго (отцовского) бутона пыльцу переносили на рыльце пестика материнского растения. Оплодотворенный цветок помечали, оплодотворение повторяли три дня. Все цветки вокруг постоянно удаляли на фазе их бутонизации. Растение изолировали пластиковым прозрачным цилиндром до созревания семян.

В поколениях F₁ и F₂ определяли размеры семян ($n = 111$ и 496 для каждого поколения соответственно). Под микроскопом измеряли длину (большая полуось эллипса, a , мм) и ширину (меньшая полуось эллипса, b , мм) семени. Площадь эллипса (S , мм²) рассчитывали по формуле $S = a \cdot b \cdot \pi$. Затем семена поколения F₂ разделяли по группам согласно их размерам – большие, средние, мелкие ($n = 49, 365, 82$ для каждой группы соответственно).

Для анализа наличия зародыша проводили под микроскопом препарирование набухших после размачивания в воде семян – нескольких представителей каждой группы.

Генотипирование и ОТ-ПЦР анализ на содержание относительного количества транскриптов генов осуществляли в образцах растений, выращенных до вегетативной фазы роста 1.14 (Boyes et al., 2001), и семенах.

Для генотипирования родительских линий *aox1a*, *vtc2* и гибридных линий потомков использовали ДНК соответствующих образцов и разработанные праймеры (табл. 1, см. рис. 2). ДНК выделяли из воздушно-сухой навески (50–100 мг) розеточных листьев или сухих семян с помощью набора Сорб-ГМО-Б («Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Для ПЦР в конечной точке использовали 4 мкл готовой смеси Screen Mix («Евроген», Россия), 4 мкл каждого из пары соответствующих праймеров (0.3 мкМ) («Синтол», Россия), 7 мкл ddH₂O («Панэко», Россия) и 1 мкл ДНК-матрицы. Амплификация включала предварительную денатурацию в течение 5 мин при температуре 95 °C и далее 35 циклов: денатурация (15 с) при температуре 95 °C, отжиг праймеров (30 с) при температуре 55 °C и элонгация (60 с) при температуре 72 °C; с окончательной элонгацией (2 мин) при температуре 72 °C. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле в Трис-ацетатном буферном растворе. Фрагменты ДНК окрашивали Safe Green Stain (APGENA, Россия). Фотодокументирование электрофореграмм выполняли с помощью SuperRay Maxi (APGENA, Россия). Маркером длины фрагментов ДНК служил 100+ bp Ladder DNA marker (100–1500 bp) («Евроген», Россия).

Относительное содержание транскриптов генов в образцах анализировали при помощи ПЦР в реальном времени на термоциклере/амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Розеточные листья растений фиксировали в жидком азоте и до начала анализа хранили при температуре –80 °C. Выделение РНК проводили набором HiPure Plant RNA Kit (Magen, Китай) согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли на флуориметре Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher

Таблица 2. Список праймеров для проведения ОТ-ПЦР *Arabidopsis thaliana*

Ген	Номер локуса	Название по NCBI	Прямой праймер (5'–3') Обратный праймер (5'–3')	Длина ПЦР продукта, п.н.
<i>AOX1a</i>	At3g22370	Альтернативная оксидаза 1А	ATGATAACTCGCGGTGGAGC TCGTCGGAGCTCTAGTCCAT	166
<i>VTC2</i>	At4g26850	ГДФ-Л-галактозофосфоорилаза 1	GGACCTCCATGGGTTCTGTT GAGGTTACTGCTCTCGCCTT	131
<i>AT2G28390*</i>	At2g28390	Белок семейства SAND	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	61
<i>AT4G34270*</i>	At4g34270	Белок семейства Т1Р41-подобных белков	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA TCAACTGGATACCCTTTCGCA	61

Примечание. Разработка праймеров выполнена с помощью Primer-BLAST (Ye et al., 2012) таким образом, чтобы они одновременно амплифицировали фрагменты всех известных сплайс-вариантов гена интереса. * Референсные гены, по (Czechowski et al., 2005).

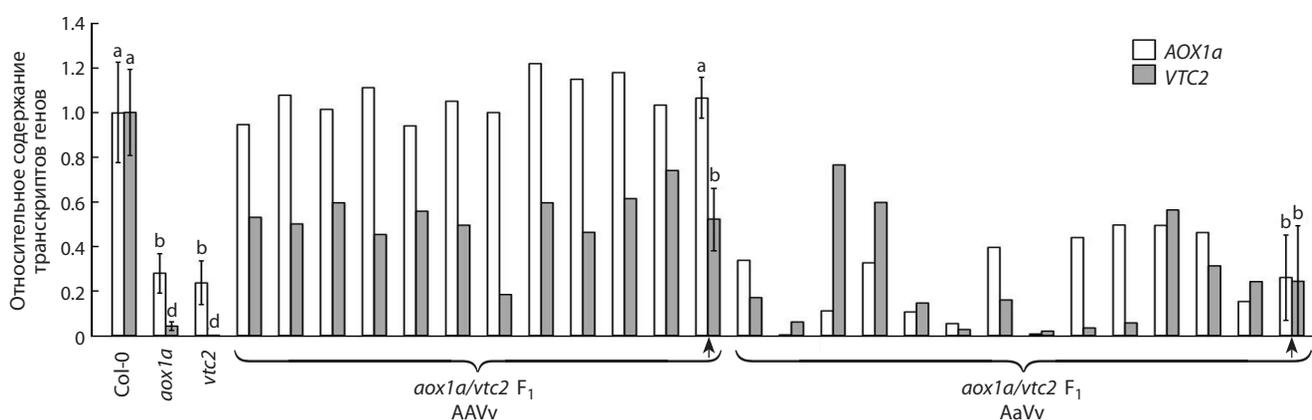


Рис. 3. Относительное количество транскриптов *AOX1a* и *VTC2* в листьях растений *A. thaliana* линий дикого типа (Col-0), родительских линий (*aox1a* и *vtc2*) и 24 растений *A. thaliana* гибридных линий (*aox1a/vtc2*) поколения F₁.

Стрелками показаны среднеарифметические величины и их стандартные ошибки параметра у предполагаемых генотипов (AAVv и AaVv). Достоверность изменений параметра отдельно для каждого гена обозначена разными строчными латинскими буквами (ANOVA, тест Дункана, $p \leq 0.05$).

Scientific, США). Для синтеза кДНК с одноцепочечной РНК-матрицы для ОТ-ПЦР применяли MMLV RT kit («Евроген», Россия) с олиго-dT праймером. ПЦР осуществляли с готовой смесью qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) и разработанными праймерами (табл. 2). Экспрессию генов нормализовали на геометрическую среднюю экспрессии генов *AT2G28390* и *AT4G34270* (Czechowski et al., 2005). Значения относительного уровня транскриптов генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ согласно (Livak, Schmittgen, 2001). Анализ проводили в трех биологических образцах, включающих листья одного гибридного растения или трех-пяти растений оригинальных линий, в двух технических повторностях для каждого образца.

Результаты

Гены *AOX1a* (At3g22370), *VTC2* (At4g26850) и *EFS* (At1g77300) расположены на третьей, четвертой и первой хромосомах *A. thaliana* соответственно. Следовательно, потомство гетерозигот в результате скрещивания линий SALK_084897 и SALK_146824C согласно несцепленному наследованию и третьему закону Менделя позволяет полу-

чить в поколении F₁ комбинирование признаков во всех возможных сочетаниях, а в поколении F₂ – потомство, гомозиготное по обоим мутациям.

ОТ-ПЦР анализ показал, что относительный уровень транскриптов *AOX1a* в линии *aox1a* был значительно ниже, чем в линии Col-0, а уровень мРНК *VTC2* в линии *vtc2* почти не детектировался (рис. 3). При этом семена линии *aox1a* заметно варьировали по размеру в отличие от линии *vtc2* (рис. 4). Эти данные косвенно свидетельствовали о гетерозиготности линии *aox1a* и гомозиготности линии *vtc2* по мутантному варианту гена интереса, что также было подтверждено наличием вставок Т-ДНК в соответствующих линиях (рис. 5). На электрофореграмме линии *vtc2* отсутствовали полосы ПЦР-продуктов пар праймеров V_4f–V_4r и V_5f–V_4r, характерных для «нормального» варианта гена, и присутствовали полосы V_4f–T-DNA_r и V5f–T-DNA_r, свидетельствующие о наличии вставки Т-ДНК. Ранее нами выявлена точная локализация вставки Т-ДНК в линии *vtc2* в положении 13499579 в экзоне 6 гена At4g26850 (Belykh et al., 2024). Полоса ПЦР-продукта пары праймеров A_2f–A_2r и ее отсутствие для пары

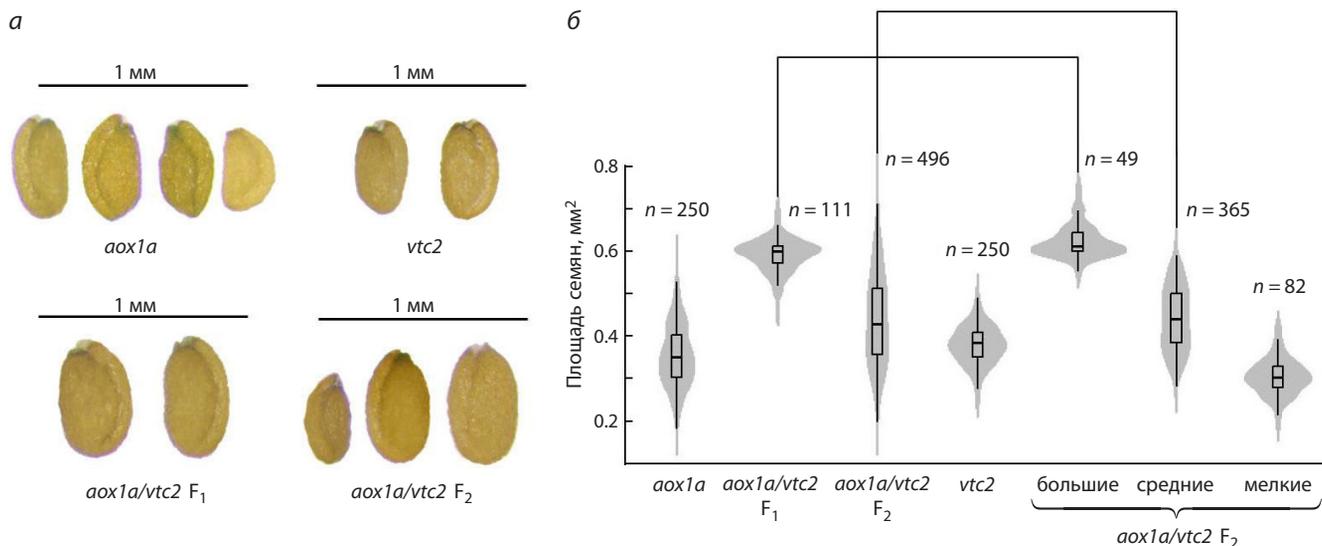


Рис. 4. Внешний вид (а) и площадь семян (б) родительских и гибридных линий (*aox1a/vtc2*) *A. thaliana* поколений F₁ и F₂.

Графики (б) представлены в виде виолоплетов с боксплотами согласно среднеарифметическим значениям и их стандартным ошибкам; *n* – размер выборки. Отличия между всеми парными параметрами, не отмеченными квадратной скобкой, значимы при *p* < 0.01 (тест Данна с поправкой Бонферрони).

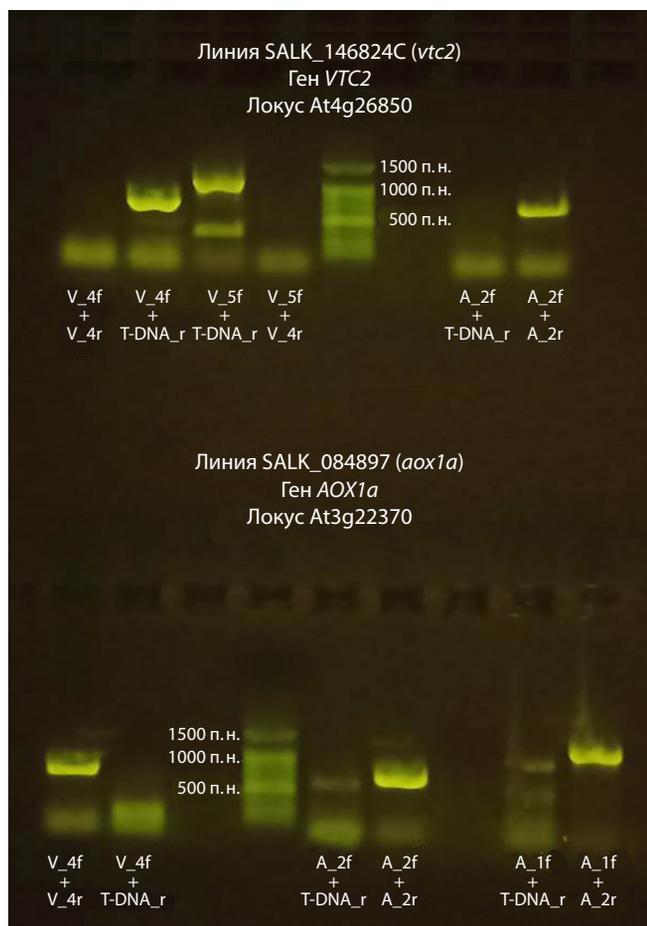


Рис. 5. Электрофореграмма ампликонов ДНК растений *A. thaliana* линий *vtc2* и *aox1a*, показывающая наличие Т-ДНК-вставок в ген *VTC2* и ген *AOX1a* соответственно.

Описание праймеров см. в табл. 1.

A_2f-T-DNA_r указывали на «нормальный» вариант гена *AOX1a*.

Линия *aox1a*, напротив, характеризовалась присутствием ПЦР-продукта пары праймеров *V_4f*-*V_4r* и отсутствием *V_4f*-T-DNA_r, что указывало на «нормальную» копию гена *VTC2* (см. рис. 5). Наличие ПЦР-продуктов всех пар праймеров для *AOX1a*, включая последовательность Т-ДНК (*A_2f*-*A_2r* и *A_2f*-T-DNA_r; *A_1f*-*A_2r* и *A_1f*-T-DNA_r), свидетельствовало как о «нормальной», так и о поврежденной вставкой Т-ДНК копиях гена, что свойственно для гетерозиготной линии.

Для предсказания расщепления в поколении F₁ составлена схема на основе решетки Пеннета, позволяющей выяснить возможные варианты генотипов потомства по генотипам родителей и их гамет путем деления числа ячеек с данным генотипом на общее число ячеек. Согласно полученной схеме, расщепление по генотипу составило 1:1:1:1 (четыре фенотипа в равных количествах) (табл. 3). Другими словами, 25 % семян F₁ принадлежало мутантной линии *AaVvEe* с дефицитом генов *VTC2* и *AOX1a*, 25 % семян приходилось на генотип *AaVvEe* с дефицитом всех генов *AOX1a*, *VTC2*, *EFS*. Остальная часть представлена генотипами с дефицитом *VTC2* и с дефицитом генов *VTC2*, *EFS*.

Семена F₁, полученные при скрещивании, статистически достоверно отличались более крупными размерами по сравнению с родительскими линиями (см. рис. 4). Это могло быть следствием гетерозиса, проявляющегося в увеличении жизнеспособности гибридов из-за унаследования определенного набора аллелей различных генов от своих разнородных родителей.

Из семян F₁ были выращены 24 растения, которые характеризовались снижением количества транскриптов *VTC2* относительно *Col-0* (см. рис. 3). Из них более поло-

Таблица 3. Решетка Пеннета для поколения F₁, полученного в результате скрещивания линий SALK_146824C (*vtc2*) и SALK_084897 (*aox1a*)

Генотип линии	SALK_084897 (<i>aox1a</i>) AaVVEe			
SALK_146824C (<i>vtc2</i>) AAVvEE	AVE	aVe	AVe	aVe
	AvE	AAVVEE	AaVvEE	AAVvEe
	AvE	AAVVEE	AaVvEE	AAVvEe
	AvE	AAVVEE	AaVvEE	AAVvEe
	AvE	AAVVEE	AaVvEE	AAVvEe
		Потомство с дефицитом <i>VTC2</i>	Потомство с дефицитом <i>VTC2</i> и <i>AOX1a</i>	Потомство с дефицитом <i>VTC2</i> и <i>EFS</i>
				Потомство с дефицитом <i>VTC2</i> , <i>AOX1a</i> , <i>EFS</i>

Примечание. А – нормальный (как в Col-0) ген *AOX1a*; а – инсерция в *AOX1a*; V – нормальный (как в Col-0) ген *VTC2*; v – инсерция в *VTC2*; E – нормальный (как в Col-0) ген *EFS*; e – инсерция в *EFS*.

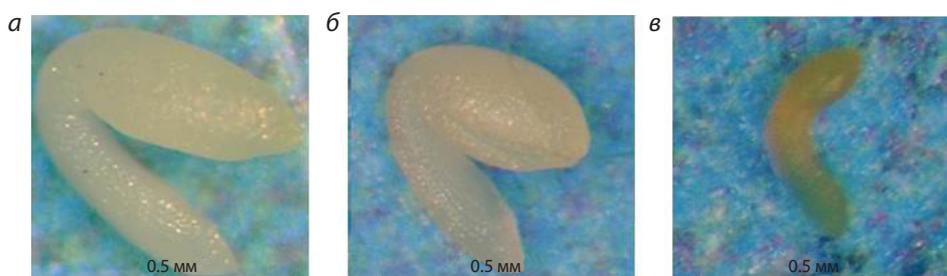


Рис. 6. Препарированные из больших (а), средних (б) и мелких семян (в) зародыши растений *A. thaliana* гибридных линий *aox1a/vtc2* поколения F₂.

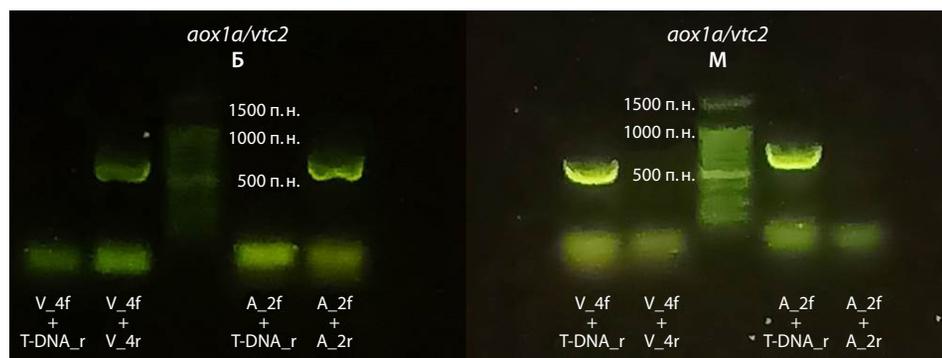


Рис. 7. Электрофореграмма ампликонов ДНК больших (Б) и мелких (М) семян *A. thaliana* гибридных линий *aox1a/vtc2* поколения F₂, показывающая наличие/отсутствие Т-ДНК-вставок в гены *AOX1a* и *VTC2*.

ДНК мелких семян показывает отсутствие полос ПЦР-продуктов пар праймеров V_{4f}-V_{4r} и A_{2f}-A_{2r}, характерных для «нормального» варианта генов *VTC2* и *AOX1a* соответственно. Описание праймеров см. в табл. 1.

вины образцов (54 %) показывали снижение транскриптов *AOX1a*. Геном остальных 46 % растений, предположительно, включал обе копии гена *AOX1a*, как в диком типе. Поэтому можно полагать, что гибридизация прошла успешно в предсказанном расщеплении.

На растениях F₁ в результате самоопыления сформировались плоды – стручки, содержащие семена F₂. Семена значительно варьировали по размерам (см. рис. 4). Для классификации по размерам семена были разделены на три достоверно различающиеся между собой группы. Интересно, что группа больших по размеру семян не отличалась от семян поколения F₁, что позволяет предположить

для них генотип AAVv или AaVv, как в поколении F₁. Мелкие семена имели дегенеративные морфологические отклонения: при препарировании детектировали недоразвитый зародыш (рис. 6). Большинство мелких семян не проросло или погибло на стадии появления проростка.

Генотипирование больших семян поколения F₂ показало наличие нормальных копий *AOX1a* и *VTC2* в геноме (рис. 7). На электрофореграмме ДНК, выделенной из мелких семян, отсутствовали полосы, соответствующие «нормальным» генам. Это свидетельствовало о том, что генотип образцов мелких семян соответствовал двойному нокаут-мутанту *aox1a/vtc2*.

Обсуждение

Исследование линий с дефицитом Аск, в первую очередь *vtc2*, показало важную роль L-галактозного пути биосинтеза витамина С и, в частности, ключевого фермента ГГФ в пополнении основного пула этого метаболита в растении. Вместе с тем полагают, что снижение роста и жизнеспособности мутантов связано не столько с пониженным уровнем Аск, сколько с нарушениями метаболизма и дисбалансом дыхательной ЭТЦ (Lim et al., 2016; Matos et al., 2022).

Такие нарушения могут быть вызваны возникающей в мутантной линии криптической мутацией (Lim et al., 2016). Однако эти же авторы показали, что дефекты роста мутантов *vtc2* сегрегируются независимо от мутации в гене *VTC2*, что указывает на локализацию потенциальной криптической мутации в данной линии на другой хромосоме и поэтому позволяет нам анализировать связь фенотипа потомства именно со статусом гена *VTC2*.

Причину нарушений метаболизма и роста выявляли в ряде работ с использованием мутантных комбинаций с *vtc2*. Фенотип снижения роста *vtc2* описан в сочетании с мутациями, вызывающими хронический фотоокислительный стресс (Müller-Moulé et al., 2004), с нокаутом хлоропластной аскорбатпероксидазы (Giacomelli et al., 2007), супрессией аутоиммунного ответа (Zhu et al., 2013). В результате скрещивания линии *A. thaliana vtc2-1* (loss-of-function мутант с сильно сниженной транскрипцией *VTC2*) с мутантной линией, нечувствительной к абсцизовой кислоте (*abi4*), получен двойной мутант *vtc2-1/abi4*, который демонстрировал рост и габитус, как у дикого типа (Kerchev et al., 2011). Авторы предположили, что АБК поддерживало фенотип низкорослости *vtc2-1*. Вместе с тем все описанные двойные нокауты сохраняли способность к росту. Летальным оказался лишь мутант с нокаутом обоих генов ГГФ – *VTC2* и *VTC5* (Dowdle et al., 2007).

Ранее первые мутанты с дефицитом Аск, *vtc1* (Conklin et al., 1996) и *vtc2* (Jander et al., 2002), были выделены по их чувствительности к озону. Известно, что чувствительность к озону может быть также результатом дисбаланса в дыхательных путях и повышенной генерации АФК на фоне низкой скорости синтеза Аск. При увеличении уровня озона ингибирование ЦП сопровождалось резким повышением активности АОХ (Ederli et al., 2006; Pasqualini et al., 2007). Это дало основание полагать, что усиление АП в линии *vtc2* предотвращает развитие окислительного стресса и возможную гибель растений.

Данное предположение подтвердилось в нашем исследовании, в котором при одновременном нокауте *AOX1a* и *VTC2* поколение F₂ было нежизнеспособным. Возможно, генетической причиной образования летальной мутации стало взаимодействие мутаций (неаллельных генов), в том числе криптической. Однако в пользу роли взаимодействия именно мутаций *AOX1a* и *VTC2*, а не *AOX1a* и криптической мутации свидетельствует тот факт, что все семена F₂, не способные к прорастанию, содержали мутацию в *VTC2*, которая, по всей видимости, с предполагаемой криптической не сцеплена (Lim et al., 2016). Для окончательного выяснения вопроса требуются бо-

лее детальные молекулярно-генетические исследования, включающие секвенирование геномной ДНК, анализ РНК для выявления мутаций, влияющих на сплайсинг пре-мРНК и т. д.

Заключение

Таким образом, при гибридизации линий SALK_084897 и SALK_146824C были получены семена F₂ разного размера. Группа мелких семян охарактеризована как аберрантные семена, имеющие дегенеративные морфологические отклонения и не способные к прорастанию. Генотипирование этих семян свидетельствовало об отсутствии *AOX1a* и *VTC2* в геноме. Полученные данные указывали на появление летальной мутации при одновременном нокауте обоих генов и жизненно важном совместном функционировании двух систем – альтернативного пути через АОХ и L-галактозного пути биосинтеза Аск, связанного с ЭТЦ митохондрий. Дальнейшее изучение аспектов взаимосвязи и координации функционирования АП и L-галактозного пути синтеза Аск может быть направлено на получение двойных мутантов с дефектами в генах, связанных с синтезом Аск, компонентов других дыхательных электрон-транспортных путей, участников гормонального и редокс-сигналинга. Такие исследования могут быть полезны для разработки генно-инженерного инструментария для улучшения синтеза Аск в целях повышения стрессоустойчивости растений, имеющих важное продовольственное значение.

Список литературы / References

- Гармаш Е.В. Сигнальные пути регуляции экспрессии генов альтернативной оксидазы растений. *Физиология растений*. 2022; 69(1):3-19. doi 10.31857/S0015330322010055
- [Garmash E.V. Signaling pathways of alternative oxidase genes expression in plants. *Russ J Plant Physiol*. 2022;69(1):1. doi 10.1134/S1021443722010058]
- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Exp Bot*. 2006;57(8):1621-1631. doi 10.1093/jxb/erl005
- Belykh E., Yadrinkhinskiy K., Golubev M., Belykh N., Velegzhaninov I., Garmash E. Localization data of the T-DNA insertion site in *Arabidopsis* line SALK_146824C. *Data Brief*. 2024;54:110309. doi 10.1016/j.dib.2024.110309
- Boyce D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*. 2001;13(7):1499-1510. doi 10.2307/3871382
- Conklin P.L., Williams E.H., Last R.L. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(18):9970-9974. doi 10.1073/pnas.93.18.9970
- 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 Physiol*. 2005; 139(1):5-17. doi 10.1104/pp.105.063743
- Del-Saz N.F., Ribas-Carbo M., McDonald A.E., Lambers H., Fernie A.R., Florez-Sarasa I. An *in vivo* perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway. *Trends Plant Sci*. 2018;23(3):206-219. doi 10.1016/j.tplants.2017.11.006
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnov N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J*. 2007;52(4):673-689. doi 10.1111/j.1365-313X.2007.03266.x

- Ederli L., Morettini R., Borgogni A., Wasternack C., Miersch O., Reale L., Ferranti F., Tosti N., Pasqualini S. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiol.* 2006;142(2):595-608. doi 10.1104/pp.106.085472
- Foyer C.H., Kyndt T., Hancock R.D. Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives, and outstanding issues. *Antioxid Redox Signal.* 2020;32(7):463-485. doi 10.1089/ars.2019.7819
- Garmash E.V. Suppression of mitochondrial alternative oxidase can result in upregulation of the ROS scavenging network: some possible mechanisms underlying the compensation effect. *Plant Biol.* 2023; 25(1):43-53. doi 10.1111/plb.13477
- Garmash E.V., Dymova O.V., Silina E.V., Malyshev R.V., Belykh E.S., Shelyakin M.A., Velegzhaninov I.O. *AOX1a* expression in *Arabidopsis thaliana* affects the state of chloroplast photoprotective systems under moderately high light conditions. *Plants (Basel).* 2022; 11(22):3030. doi 10.3390/plants11223030
- Garmash E.V., Silina E.V., Belykh E.S., Shelyakin M.A., Malyshev R.V. Alternative oxidase affects ascorbate metabolism in *Arabidopsis thaliana* plants under high-light conditions: possible links between respiratory electron transport pathways in mitochondria. *J Biosci.* 2024;49:94. doi 10.1007/s12038-024-00471-6
- Giacomelli L., Masi A., Ripoll D.R., Lee M.J., van Wijk K.J. *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol Biol.* 2007;65:627-644. doi 10.1007/s11103-007-9227-y
- Jander G., Norris S.R., Rounsley S.D., Bush D.F., Levin I.M., Last R.L. Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol.* 2002;129(2):440-450. doi 10.1104/pp.003533
- Kerchev P.I., Pellny T.K., Vivancos P.D., Kiddle G., Hedden P., Driscoll S., Vanacker H., Verrier P., Hancock R.D., Foyer C.H. The transcription factor ABI4 is required for the ascorbic acid-dependent regulation of growth and regulation of jasmonate-dependent defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2011;23(9):3319-3334. doi 10.1105/tpc.111.090100
- Lim B., Smirnoff N., Cobbett C.S., Golz J.F. Ascorbate-deficient *vtc2* mutants in *Arabidopsis* do not exhibit decreased growth. *Front Plant Sci.* 2016;7:1025. doi 10.3389/fpls.2016.01025
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi 10.1006/meth.2001.1262
- Matos I.F., Morales L.M.M., Santana D.B., Silva G.M.C., Gomes M.M.A., Ayub R.A., Costa J.H., de Oliveira J.G. Ascorbate synthesis as an alternative electron source for mitochondrial respiration: possible implications for the plant performance. *Front Plant Sci.* 2022;13: 987077. doi 10.3389/fpls.2022.987077
- Müller-Moulé P., Golan T., Niyogi K.K. Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiol.* 2004;134(3):1163-1172. doi 10.1104/pp.103.032375
- Pasqualini S., Paolocci F., Borgogni A., Morettini R., Ederli L. The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 2007;30(12):1545-1556. doi 10.1111/j.1365-3040.2007.01730.x
- Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med.* 2018;122:116-129. doi 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033
- Sweetman C., Waterman C.D., Wong D.C.J., Day D.A., Jenkins C.L.D., Soole K.L. Altering the balance between AOX1A and NDB2 expression affects a common set of transcripts in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2022;13:876843. doi 10.3389/fpls.2022.876843
- Talla S., Riazunnisa K., Padmavathi L., Sunil B., Rajsheel P., Raghavendra A.S. Ascorbic acid is a key participant during the interactions between chloroplasts and mitochondria to optimize photosynthesis and protect against photoinhibition. *J Biosci.* 2011;36:163-173. doi 10.1007/s12038-011-9000-x
- Van Aken O. Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signaling. *Plant Physiol.* 2021;186(1):36-52. doi 10.1093/plphys/kiab101
- Vanlerberghe G.C., Dahal K., Alber N.A., Chadee A. Photosynthesis, respiration and growth: a carbon and energy balancing act for alternative oxidase. *Mitochondrion.* 2020;52:197-211. doi 10.1016/j.mito.2020.04.001
- Vishwakarma A., Tetali S.D., Selinski J., Scheibe R., Padmasree K. Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* 2015;116(4):555-569. doi 10.1093/aob/mcv122
- Wheeler G., Ishikawa T., Pornsaksit V., Smirnoff N. Evolution of alternative biosynthetic pathways for vitamin C following plastid acquisition in photosynthetic eukaryotes. *eLife.* 2015;13(4):e06369. doi 10.7554/eLife.06369
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. doi 10.1186/1471-2105-13-134
- Yoshimura K., Nakane T., Kume S., Shiomi Y., Maruta T., Ishikawa T., Shigeoka S. Transient expression analysis revealed the importance of *VTC2* expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(1): 60-66. doi 10.1080/09168451.2014.877831
- Zhu Y., Du B., Qian J., Zou B., Hua J. Disease resistance gene-induced growth inhibition is enhanced by *rcd1* independent of defence activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2013;161(4):2005-2013. doi 10.1104/pp.112.213363

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.07.2025. После доработки 13.11.2025. Принята к публикации 14.11.2025.