



УДК 577.113+123.5

С. А. Мартынов, И. Г. Бух, А. Ю. Мирюта, Т. С. Даниленко,
Т. П. Перерва, С. С. Малюта

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ЛИНЕЙНЫХ ПЛАЗМИД МИТОХОНДРИЙ КУКУРУЗЫ НА ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЯХ

В работе изучали способность митохондриальных плазмид кукурузы осуществлять в ядре регуляторную функцию, подобную той, которую они осуществляют в митохондриях. Для этого в зародыши зерновки кукурузы вводили рекомбинантные плазмиды, содержащие S1- и S2- последовательности митохондриальной ДНК кукурузы, с тем, чтобы исходя из свойств растений потомков выяснить возможность включения в метаболизм растительной клетки линейных плазмид митохондрий. Анализ полученных данных на проростках семян и на взрослых растениях кукурузы свидетельствует о возможном влиянии на жизнеспособность растительной клетки обработки растений кукурузы рекомбинантными плазмидами, содержащими S1-и S2- последовательности митохондриальной ДНК.

Введение. Явление цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) у высших растений известно с 1920 года и до сих пор продолжает оставаться предметом интенсивного изучения [1, 2]. Как известно, у кукурузы обнаружены три типа ЦМС — ЦМС Т, ЦМС С и ЦМС S, идентифицированных первоначально по их отношению к ядерным генам — восстановителям фертильности. У ЦМС линий S-типа признак мужской стерильности связывают с присутствием в препаратах митохондриальной ДНК линейных плазмидоподобных структур, названных впоследствии S1 и S2 [3]. Сложность ядерно-цитоплазматических отношений, определяющих контроль стерильности — фертильности у кукурузы с ЦМС-цитоплазмой (особенно в случае S-типа), привела к появлению концепции эписомального элемента фертильности, который, будучи фиксированным в цитоплазме (цитоплазматические ревертанты) или в ядре (ядерные ревертанты), обуславливает возникновение фертильного фенотипа [4]. В отношении цитоплазматических ревертантов такая концепция представляется вполне состоятельной, поскольку в последние годы она получила экспериментальное подтверждение. Сейчас хорошо известно, что восстановление фертильности у цитоплазматических ревертантов ЦМС-растений S-типа связано со встраиванием S1- и S2- последовательностей в митохондриальную ДНК [5, 6]. При этом в митохондриях наблюдается исчезновение свободных форм S1, S2 и встраивание их в митохондриальную ДНК осуществляется в четко определенных локусах, прилегающих к генам цитохром-с-оксидазы и АТФазы [7, 8]. Несмотря на то, что механизм цитоплазматической реверсии до конца не понятен, общая картина выглядит достаточно четкой и позволяет рассматривать S1- и S2-плазмиды как регуляторные элементы митохондриальных генов.

В отношении механизмов осуществления ядерного контроля проявления стерильности у растений с ЦМС-цитоплазмой также имеется большое количество работ. Однако они, как правило, носят чисто генетический характер и не позволяют судить о том, насколько функции

© С. А. МАРТЫНОВ, И. Г. БУХ, А. Ю. МИРЮТА, Т. С. ДАНИЛЕНКО, Т. П. ПЕРЕРВА,
С. С. МАЛЮТА, 1992

генов-восстановителей связаны с функцией S1- и S2-плазмидоподобных структур. С одной стороны, имеются данные, что в восстановлении фертильности у ЦМС-растений может принимать участие транспозабельный элемент, способный в дополнение к стандартному гену-восстановителю *RF3* занимать место на второй хромосоме [9]. С другой стороны, Кембел и соавт. [21] показали, что в ядерных ДНК ядерных ревертантов, ЦМС-стерильных растений и цитоплазматических ревертантов имеются копии S1-последовательности и отсутствуют копии S2. Кроме того, ядро не содержит также S1- и S2-копий в виде автономных структур. Таким образом, вопрос о справедливости концепции роли S1- и S2-плазмидоподобных элементов фертильности на уровне ядра остается открытым, поскольку функция S1-копии, встроившей в ядерную ДНК, непонятна, так же как непонятно, способны ли S1- и S2-плазмиды осуществлять в ядре регуляторную функцию, подобную той, которую они выполняют в митохондриях. В связи с успехами в области генетической инженерии растений решение подобного вопроса открывает новые возможности. Какую роль играет присутствие митохондриальных плазмид в клеточном ядре, можно выяснить путем прямого введения в клетку этих ДНК в составе искусственных рекомбинантных плазмид. Известно, что в тех случаях, когда рекомбинантную плазмиду удается внедрить в растительную клетку, она обнаруживается в ядре [10, 11]. Среди способов, разработанных для введения экзогенной ДНК в растительную клетку, определенные преимущества имеет использование пыльцевой системы. По сравнению с системами, основанными на получении протопластов, этот способ проще и позволяет вести работу с представителями однодольных на уровне взрослых растений. Эффективность генетической трансформации при использовании пыльцевой системы показана для различных видов растений и генетических маркеров [14, 15]. Таким образом, имеются основания считать, что обработка кукурузных рылец смесью пыльцы и плазмидной ДНК обеспечивает вхождение последней в клеточное ядро зародыша будущего зерна. Сравнение растений, полученных в результате такой обработки, с контрольными позволяет судить о наличии или отсутствии физиологического эффекта подобного воздействия.

Цель настоящей работы заключалась в выяснении возможности влияния на метаболизм растительной клетки линейных плазмид митохондрий в составе рекомбинантных структур.

Материалы и методы. В работе использованы фертильная линия кукурузы ВИР 44 и ее ЦМС-аналог ВИР 44 МС, полученные на Краснодарской опытной станции. Препараты ядерной ДНК кукурузы выделяли согласно методике [16]; препараты митохондриальной ДНК — по методу Хемсона и др. [17]; линейные структуры плазмидоподобных ДНК митохондрий кукурузы получали, как описано в [18]. Рекомбинантные плазмиды конструировали в соответствии с методами, описанными в руководстве [19]. В качестве вектора нами использована плаزمид *pBR322*. На ее основе получены рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты S1- и S2-структур митохондриальной ДНК кукурузы. Плазмиды, названная *pZMS8*, содержит фрагмент S1-последовательности от уникального сайта *SalGI* и включает область гомологии около 5392 п. о. Вторая плазмиды, *pZMH65*, содержит фрагмент S2-последовательности от уникального сайта *HindIII* до конца плазмиды с областью гомологии около 3600 п. о. В случае первой плазмиды вставку встраивали по *SalGI*, а в случае второй — в сайт *HindIII* плазмиды *pBR322*. Структурной особенностью обеих гибридных плазмид является невозможность вырезания вставок из-за соединения их с векторной молекулой по тупым концам.

Растения обрабатывали плазмидной ДНК через 1—5 ч после опыления кукурузы впрыскиванием раствора ДНК (50 мкг/мл) при степени очистки препарата 60—70 % в завязь из расчета 1,5—2,0 мл на один початок. Контролем служили растения, обработанные таким же

образом 0,1 М раствором SSC. Собранный пыльцу растений анализировали для выявления морфологических признаков фертильности и стерильности. При этом пыльца, наполненная крахмальными зёрнами, условно считалась фертильной, а пустая пыльца с целой оболочкой — стерильной. Микроскопии подвергали препараты нативной пыльцы, а также пыльцы, окрашенной кармином. Полученные результаты анализировали как на уровне числа просмотренных под микроскопом пыльцевых гранул, так и на уровне обследованных растений.

Всхожесть и динамику роста семян исследовали, высевая их на 0,75 %-ю голодную агаризованную среду в чашках Петри. Учитывали всхожесть на 3-и сут. О динамике роста семян судили по размеру стебля на 3, 5, 7-е сут, а также по размеру корня, определяемому на 3-и и 7-е сут. Массу полученных проростков устанавливали на 7-е сут.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли по [20].

Результаты и обсуждение. Первую обработку растений плазмидными ДНК проводили в условиях полевого опыта в 1985 г. В следующем году семена растений каждого варианта были посеяны на опытном участке, а семена полученного урожая высевали в теплице в 1986 и 1987 гг. Физиологические последствия обработки растений плазмидными ДНК первоначально анализировали на уровне пыльцы по признаку количественного соотношения стерильных и фертильных гранул и по числу растений со стерильной пыльцой. Данные этих исследований представлены в табл. 1. Как можно видеть из приведенных данных, обработанные плазидами варианты растений характеризуются достоверным снижением числа стерильных зёрен с соответственным уменьшением числа растений (статистически недостоверным), в составе которых обнаруживались стерильные пыльцевые гранулы. Следует отметить, что, хотя снижение количества растений со стерильной пыльцой и выглядит статистически недостоверным из-за малой выборки обследованных растений, тем не менее и в этом случае наблюдается та же тенденция, что и со стерильными гранулами, а именно: наибольшее снижение доли стерильных экземпляров отмечено в результате обработки препаратом ДНК рекомбинантной плазмиды *pZMH65*, содержащей S2-последовательность митохондриальной ДНК кукурузы. Этот результат послужил дальнейшим (уже экспериментальным) основанием для изучения всхожести и динамики роста семян в каждом варианте (табл. 2). Выявленная разница между контрольным и двумя опытными вариантами достоверна с надёжностью 0,9—0,99, однако, как можно видеть из данных таблицы, в варианте обработки растений S1-содержащей плазмидой она сдвинута в сторону уменьшения количественных признаков, а при обработке растений S2-содержащей плазмидой — в сторону их увеличения. Причины этого отличия объяснить трудно, особенно при учёте совпадения данных обоих вариантов по пыльце во втором и третьем поколении (урожаи 1986—1987 гг.). В то

Таблица 1

Относительное количество стерильных пыльцевых зёрен и стерильных растений в разных вариантах опыта

Вариант опыта	Пыльцевые зёрна (III поколение)			Растения (II поколение)		
	Всего просмотрено	Стерильные зёрна		Всего обследовано	Со стерильной пыльцой	
		Число	%		Число	%
Контроль	8000	50	0,62±0,87	35	10	28,5±8,55
Обработка плазидами:						
<i>pZMS8</i> (S1)	47000	25	0,05±0,011	33	2	6,06±4,24
<i>pZMH65</i> (S2)	30000	10	0,03±0,010	83	4	4,68±2,40

же время следует помнить, что если используемым плазмидам удастся достичь ядра, то в случае плазмиды *pZMS8* оно получит увеличенный набор S1-последовательностей, а в случае плазмиды *pZMH65* — сочетание S1- и S2-последовательностей, которые обычно присутствуют в митохондриальной ДНК кукурузы, что, очевидно, является наиболее физиологичным для растительной клетки этого вида.

Дальнейшее сравнение признаков у обработанных плазмидами и контрольных вариантов вели уже на уровне взрослых растений. Семена опытных вариантов урожая 1987 (поле) и 1988 гг. (теплица) были высеяны и самоопылены в полевом опыте. Растения полученного урожая сравнивали с контрольными по высоте и массе самих растений, количеству, массе и длине початков, а также по массе 1000 зерен. По всем перечисленным параметрам потомство растений, обработанных S1-содержащей плазмидой, соответствовало контрольным растениям, то есть обнаруженное в опытах на проростках отставание по величине корня, стебля и массы (3-дневные проростки) у взрослых растений уже не просматривались. В потомстве обработанных S2-содержащей плазмидой растений (V и VI поколения) обнаружены статистически достоверные (при доверительном уровне 0,95) отличия от контрольных растений по массе растений и средней массе всех початков на одном растении. Эти данные сведены в табл. 3.

Таким образом, мы обнаружили, что у растений, обработанных рекомбинантной плазмидой, содержащей S1-последовательность, вначале наблюдается нестабильное повышение жизнеспособности, о чем судили по составу пыльцы потомства второго поколения, с последующим подавлением ростовых характеристик (проростки растений третьего поколения) и постепенное уравнивание их до уровня контрольных растений (взрослые растения V и VI поколений). У потомков растений, обработанных рекомбинантной плазмидой, содержащей S2-последовательность, наблюдаются стойкие статистически достоверные отличия от контрольных вариантов в сторону усиления ростовых характеристик и увеличения доли фертильных пыльцевых гранул. Этот эффект срав-

Таблица 2

Динамика роста семян, полученных в опытных и контрольных вариантах экспериментов

Вариант опыта	Число проросших семян из 30	Корень, мм	По отношению к контролю, %	Стебель, мм	По отношению к контролю, %	Масса проростка, мг	По отношению к контролю, %
Контроль	29	34	100	13	100	345	100
Обработка плазмидами:							
<i>pZMS8</i> (S1)	26	21,45	63,08	6,7	51,54	231	66,95
<i>pZMH65</i> (S2)	30	43	126,47	20	153,7	467	136,36

Таблица 3

Сравнительная характеристика потомства растений, обработанных S2-содержащей плазмидой, и контрольных растений

Вариант опыта	Масса растения, г	По отношению к контролю, %	Средняя масса всех початков на одном растении, г	По отношению к контролю, %
Контроль	3386,7±62,40	100	233,11±37,32	100
Обработка плазмидой <i>pZMH65</i> :				
урожай 1987 г., V поколение;	1040,29±67,13	292,38	384,78±23,52	165,14
урожай 1988 г., VI поколение	1141,86±172,14	292,82	406,60±62,00	174,51

ним с наблюдаемым при встройке митохондриальных плазмид в митохондриальную ДНК в процессе цитоплазматической реверсии к фертильности повышением общего энергетического уровня и жизнеспособности растения. Следует отметить, что, как в случае описанной в литературе цитоплазматической реверсии, в наших экспериментах основные изменения прослеживались на растениях, обработанных плазмидой, содержащей S2-последовательность митохондриальной ДНК кукурузы. Сопоставление полученных нами экспериментальных результатов с данными Кембела и соавт. [21], установивших наличие в ядерной ДНК кукурузы только копий структуры S1 и отсутствие S2-копий, позволяет предположить, что на уровне митохондриальной и на уровне ядерной ДНК жизнеспособность растительной клетки повышается при застраивании в них обоих типов митохондриальных плазмид.

Summary. The study of linear mitochondrial plasmids: function in intact maize plants. The experimental results obtained as well as the data of other authors permit to presume both the mitochondrial and the nuclear DNAs increase the cell vitality when S1 and S2 mitochondrial plasmids are integrated.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Laughman J. R., Gabay-Laughman S. Cytoplasmic male sterility in maize//Ann. Rev. Genet.—1983.—17.— P. 27—48.
2. Tudzynski P., Pogmann P., Neuhaus H. Extrakaryotic inheritance: mitochondrial genetics//Progr. Bot.—1986.—48.— P. 249—253.
3. Unique DNA associated with mitochondria in the «S» type cytoplasms of male sterile maize/D. R. Pring et al.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 7.— P. 2409.
4. Hanson M. R., Conde M. F. Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants//Int. Rev. Cytol.—1985.—94.— P. 213—267.
5. Thompson R. D., Kemble R. J., Flavell R. B. Variations in mitochondrial DNA organization between normal and male-sterile cytoplasms of maize//Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 9.— P. 1999—2008.
6. Schardi C. L., Pring D. R. Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S-type male-sterile maize//Cell.—1985.—43, N 2.— P. 361—368.
7. Characterization of cytoplasmic male sterility in *Petunia hybrida* and *Zea mays*. Localization and activity of cytochrome oxidase/R. J. Bino, I. C. J. M. Suurs, S. J. de Hoop et al.//Euphytica.—1986.—35, N 3.— P. 905—918.
8. The mitochondrial genome of fertile maize (*Zea mays* L.) contains two copies of the gene encoding the α -subunit of the F₁-ATPase/P. G. Isaac, A. Brennicke, S. M. Dunbar, C. J. Leaver//Curr. Genet.—1985.—10, N 2.— P. 321—328.
9. Cytoplasmic reversion of cms-S in maize association with a transpositional event/C. S. Levings, B. D. Kim, D. R. Pring et al.//Science.—1980.—209, N 4.— P. 1021.
10. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells/L. Herrera-Estrella, M. de Block, E. Massens et al.//EMBO J.—1983.—2, N 6.— P. 987—995.
11. Direct gene transfer to plants/J. Paszkowski et al.//Ibid.—1984.—3, N 12.— P. 2717.
12. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts/R. Hain, P. Stabel, A. P. Czernilofsky et al.//Mol. and Gen. Genet.—1985.—199, N 1.— P. 161—168.
13. Direct gene transfer to cell of a graminaceans monocot/J. Potricus, M. W. Saul, J. Petruska et al.//Ibid.— P. 183—188.
14. Ohta Y. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA //Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 5.— P. 715—719.
15. Hess D. The pollen system of gene transfer//Genetic manipulation in plant breeding.—Berlin; New York: Walter de Gruyter and Co, 1986.— P. 803—811.
16. Watson J. C., Thompson W. F. Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA//Meth. Enzymol.—1986.—118.— P. 57—63.
17. The isolation of mitochondria and mitochondrial DNA/M. R. Hanson, M. L. Boeshore, P. E. McClean et al.//Ibid.— P. 437—443.
18. Levings C. S., Pring D. R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and texas cytoplasmic male-sterile maize//Science.—1976.—193, N 4228.— P. 158—161.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 477 с.
20. Плохинский Н. А. Биометрические методы в генетических исследованиях//Актуал. вопр. соврем. генетики.— М.: Изд-во МГУ, 1966.— 602 с.
21. Kemble R. J., Thompson R. D. S1 and S2, the linear mitochondrial DNAs present in a male sterile line of maize, possess terminally attached proteins//Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 24.— P. 8181—8190.