



УДК 517.113+123.5

С. А. Мартинов, І. Г. Бух, Г. Ю. Мірюта,  
Т. С. Даниленко, Т. П. Перерва, С. С. Малюта

## ВИВЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ РОЛІ ЛІНІЙНИХ ПЛАЗМІД МІТОХОНДРІЙ КУКУРУДЗИ НА ІНТАКТНИХ РОСЛИНАХ

*В роботі вивчали здатність мітохондріальних плазмід кукурудзи виконувати в ядрі регуляторну функцію, подібну до тої, яку вони здійснюють у мітохондріях. Для цього до зародку зернівки кукурудзи вводили рекомбінантні плазмиди, які містили S1- та S2- послідовності мітохондріальної ДНК кукурудзи, для того, щоб, виходячи з властивостей рослин нащадків, з'ясувати можливість включення до метаболізму рослинної клітини лінійних плазмід мітохондрій. Аналіз отриманих на проростках сім'ян та на дорослих рослинах кукурудзи даних свідчить про можливий вплив на життєздатність рослинної клітини обробки рослин кукурудзи рекомбінантними плазмидами, які містили S1- та S2- послідовності мітохондріальної ДНК.*

**Вступ.** Явище цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) у вищих рослин відомо з 1920 року і до нині інтенсивно вивчається [1, 2]. Як відомо, в кукурудзі виявлено три типи ЦЧС—ЦЧС Т, ЦЧС С і ЦЧС S, які спочатку були ідентифіковані за їх відношенням до ядерних генів—відновлювачів фертильності. У ЦЧС ліній S-типу ознаку чоловічої стерильності пов'язують з присутністю у препаратах мітохондріальної ДНК лінійних плазмідоподібних структур, які були названі згодом S1 та S2 [3]. Складність ядерно-цитоплазматичних відносин, що визначають контроль стерильності—фертильності у кукурудзі з ЦЧС-цитоплазмою (особливо у випадку S-типу), привела до появи концепції епісомального елемента фертильності, котрий за умов фіксації у цитоплазмі (цитоплазматичні ревертанти) або у ядрі (ядерні ревертанти) обумовлює виникнення фертильного фенотипу [4]. Щодо цитоплазматичних ревертантів така концепція уявляється досить слушною, тому що останніми роками вона отримала експериментальне підтвердження. Зараз добре відомо, що відновлення фертильності у цитоплазматичних ревертантів ЦЧС-рослин S-типу пов'язане з вбудовуванням S1 та S2-послідовностей до мітохондріальної ДНК [5, 6]. При цьому в мітохондріях спостерігається зникнення вільних форм S1 та S2 і вбудовування їх до мітохондріальної ДНК здійснюється у чітко визначених локусах, які прилягають до генів цитохром-с-оксидази та АТФази [7, 8]. Не дивлячись на те, що механізм цитоплазматичної реверсії не є до кінця зрозумілим, загальна картина виглядає досить чіткою і дозволяє розглядати S1- та S2-плазмиди як регуляторні елементи мітохондріальних генів.

Щодо механізмів здійснення ядерного контролю виявлення стерильності у рослин з ЦЧС-цитоплазмою також є велика кількість робіт. Проте вони, як правило, мають чисто генетичний характер, і не дозволяють судити про те, наскільки функції генів-відновлювачів пов'язані з функцією S1- та S2-плазмідоподібних структур. З одного бо-

ку, є дані про те, що у відновленні фертильності у ЦЧС-рослин може приймати участь транспозабельний елемент, здатний на додаток до стандартного гена-відновлювача *RF3* займати місце на другій хромосомі [9]. З іншого боку, Кембел із співавт. [21] показали, що у ядерних ДНК ядерних ревертантів, ЦЧС-стерильних рослин і цитоплазматичних ревертантів є копії *S1*-послідовності і відсутні копії *S2*. Крім того, ядро не містить також *S1*- та *S2*-копій у вигляді автономних структур. Таким чином, питання про слухність концепції ролі *S1*- та *S2*-плазмідоподібних елементів фертильності на рівні ядра залишається відкритим, оскільки функція *S1*-копії, вбудованої до ядерної ДНК, незрозуміла, також є незрозумілим, чи здатні *S1*- та *S2*-плазмиди здійснювати у ядрі регуляторну функцію, подібну до тої, яку вони виконують у мітохондріях. У зв'язку з досягненнями у галузі генетичної інженерії рослин вирішення такого питання здобуло нові можливості. Яку роль відіграє присутність мітохондріальних плазмід у клітинному ядрі, можна з'ясувати шляхом прямого введення до клітини цих ДНК у складі штучних рекомбінантних плазмід. Відомо, що у тих випадках, коли рекомбінантну плазмиду вдається впровадити до рослинної клітини, вона виявляється у ядрі [10, 11]. Серед заходів, розроблених для введення екзогенної ДНК до рослинної клітини, певні переваги має використання пилкової системи. У порівнянні з системами, які засновані на отриманні протопластів, цей засіб простіший і дозволяє провадити роботу з представниками однодольних на рівні дорослих рослин. Ефективність генетичної трансформації з використанням пилкової системи показана для різних видів рослин і генетичних маркерів [14, 15]. Таким чином, є підстави вважати, що обробка кукурудзяних приймочок сумішшю пилка та плазмідної ДНК забезпечує входження останньої до клітинного ядра зародку майбутнього зерна. Порівняння рослин, отриманих в результаті такої обробки, з контрольними дозволяє судити про наявність або відсутність фізіологічного ефекту подібної дії.

Метою цієї роботи було з'ясування можливості впливу на метаболізм рослинної клітини лінійних плазмід мітохондрій у складі рекомбінантних структур.

**Матеріали і методи.** У роботі використані фертильна лінія кукурудзи ВІР 44 та її ЦЧС-аналог ВІР 44 ЧС, отримані на Краснодарській дослідній станції. Препарати ядерної ДНК кукурудзи виділяли за методикою [16]; препарати мітохондріальної ДНК — за методом Хемсона та ін. [17]; лінійні структури плазмідоподібних ДНК мітохондрій кукурудзи отримувати, як наведено у [18]. Рекомбінантні плазмиди конструювали згідно з методами, наведеними у посібнику [19]. Плазмиди *pBR322* використана нами як вектор. На її ґрунті отримано рекомбінантні плазмиди, які містили фрагменти *S1*- та *S2*-структур мітохондріальної ДНК кукурудзи. Плазмиди, яку назвали *pZMS8*, містить фрагмент *S1*-послідовності від унікального сайту *SalGI* та включає область гомології біля 5392 п. о. Друга плазмиди, *pZMH65*, містить фрагмент *S2*-послідовності від унікального сайту *HindIII* до кінця плазмиди з областю гомології біля 3600 п. о. У випадку першої плазмиди вставку вбудовували за *SalGI*, а у випадку другої — до сайту *HindIII* плазмиди *pBR322*. Структуровою особливістю обох гібридних плазмід є неможливість вирізування вставок через поєднання їх з векторною молекулою за тупими кінцями.

Рослини обробляли плазмідною ДНК через 1—5 год після запилення кукурудзи впорскуванням розчину ДНК (50 мкг/мл) за ступеня очищення препарату 60—70% до зав'язі з розрахунку 1,5—2,0 мл на один качан. За контроль слугували рослини, оброблені таким же чином 0,1 М розчином SSC. Зібраний пилоск рослин аналізували з метою виявлення морфологічних ознак фертильності і стерильності. При цьому пилоск, наповнений крохмальовими зернами, умовно вважали фертильним, а порожній пилоск з цілісною оболонкою — стерильним. Мік-

роскопіюванню піддавали препарати нативного пилку, а також пилко, який було пофарбовано карміном. Отримані результати аналізували як на рівні кількості переглянутих під мікроскопом пилкових гранул, так і на рівні обстежених рослин.

Схожість та динаміку росту сім'ян досліджували, висіваючи їх на 0,75 %-е голодне агарізоване середовище у чашках Петрі. Враховували схожість на 3-ю добу. Про динаміку росту сім'ян судили з розміру стеблини на 3, 5, 7-у добу, а також за розміром кореня, який визначали на 3-ю та 7-у добу. Масу отриманих проростків встановлювали на 7-у добу.

Статистичну обробку експериментальних даних робили за [20].

**Результати і обговорення.** Першу обробку рослин плазмідними ДНК провадили за умов польового досліду у 1985 р. Наступного року насіння рослин кожного варіанту було посіяно на дослідній ділянці, а насіння отриманого врожаю висівали у теплиці у 1986 та 1987 рр. Фізіологічні наслідки обробки рослин плазмідними ДНК спочатку аналізували на рівні пилку за ознакою кількісного співвідношення стерильних і фертильних гранул та за кількістю рослин з стерильним пилком. Дані цих досліджень наведено у табл. 1. Як можна бачити з наведених даних, оброблені плазмідами варіанти рослин характеризуються достовірним зниженням кількості стерильних зернин з відповідним зменшенням кількості рослин (статистично недостовірним), у складі яких виявлялися стерильні пилкові гранули. Слід відзначити, що, хоча зниження кількості рослин із стерильним пилком і виглядає статистично недостовірним через малу вибірку обстежених рослин, проте й у цьому випадку спостерігається та ж тенденція, що і з стерильними гранулами, а саме: найбільше зниження частки стерильних екземплярів відзначається в результаті обробки препаратом ДНК рекомбінантної плазмиди *pZMH65*, яка містила S2-послідовність мітохондріальної ДНК кукурудзи. Цей результат став подальшою (вже експериментальною) підставою для вивчення схожості та динаміки росту насіння у кожному варіанті (табл. 2). Виявлена різниця між контрольними та двома дослідними варіантами достовірна з надійністю 0,9—

Таблиця 1

Відносна кількість стерильних пилюнок та стерильних рослин у різних варіантах досліду

Варіант досліду	Пилки (III покоління)			Рослини (II покоління)		
	Загалом переглянуто	Стерильні зернини		Загалом обстежено	З стерильним пилком	
		Кількість	%		Кількість	%
Контроль	8000	50	0,62±0,87	35	10	28,5±8,55
Обробка плазмідами:						
<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

Таблиця 2

Динаміка росту сім'ян, отриманих у дослідних та контрольних варіантах експериментів

Варіант досліду	Кількість сім'ян, які проросли	Корінь, мм	Порівняно з контролем, %	Стеблина, мм	Порівняно з контролем, %	Маса проростку, мг	Відносно контролю, %
Контроль	29	34	100	13	100	345	100
Обробка плазмідами:							
<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

0,99, проте, як можна побачити з даних таблиці, у варіанті обробки рослин плазмідом, яка містила S1, вона зсунута у бік зменшення кількісних ознак, а при обробці рослин плазмідом, що містила S2,— у бік їх збільшення. Причини цієї відзнаки пояснити важко, особливо якщо врахувати збіг даних обох варіантів за пилком у другому та третьому поколіннях (врожаї 1986—1987 рр.). У той же час слід пам'ятати, що коли використані плазміди вдається досягнути ядра, то у випадку плазміді rZMS8 воно одержить збільшений набір S1-послідовностей, а у випадку плазміді rZMH65 — сполучення S1- та S2-послідовностей, які звичайно є присутніми у мітохондріальній ДНК кукурудзи, що, мабуть, є найбільш фізіологічним для рослинної клітини цього виду.

Подальше порівняння ознак в оброблених плазмідами та контрольних варіантах робили вже на рівні дорослих рослин. Насіння дослідних варіантів врожаю 1987 (поле) та 1988 рр. (теплиця) було посіяно та самозапилено у польовому досліді. Рослини одержаного врожаю порівнювали з контрольними за розміром та масою самих рослин, кількістю, масою та довжиною качанів, а також за масою 1000 зернин. За всіма наведеними параметрами потомство рослин, оброблених плазмідом з S1, відповідало контрольним рослинам, тобто виявлене у досліді на проростках відставання за величиною кореня, стеблини та маси (3-денні проростки) в дорослих рослин вже не було помітним. У потомстві рослин, оброблених плазмідом з S2 (V та VI покоління), виявлені статистично достовірні (за надійного рівня 0,95) відміни від контрольних за масою рослин та середньою масою усіх качанів на одній рослині. Ці дані зведено до табл. 3.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика потомства рослин, оброблених плазмідом, яка містить S2, та контрольних рослин

Варіант досліді	Маса рослин, г	Порівняно з контролем, %	Середня маса усіх качанів на одній рослині, г	Порівняно з контролем, %
Контроль	3686,7±62,40	100	233,11±37,32	100
Обробка плазмідом rZMH65:				
урожай 1987 р., V покоління	1040,29±67,13	292,38	384,78±23,52	165,14
урожай 1988 р., VI покоління	1141,86±172,14	292,82	406,60±62,00	174,51

Таким чином, ми виявили, що в рослин, оброблених рекомбінантною плазмідом, яка містить S1-послідовність, спочатку спостерігається нестабільне підвищення життєздатності, про що судили з складу пилку нащадків другого покоління, з наступним пригніченням характеристик росту (проростки рослин третього покоління) та поступове вирівнювання їх до рівня контрольних рослин (дорослі рослини V та VI поколінь). У нащадків рослин, оброблених рекомбінантною плазмідом, яка містила S2-послідовність, спостерігаються стійкі статистично достовірні відзнаки від контрольних варіантів у бік посилення характеристик росту та збільшення частки фертильних пилкових гранул. Цей ефект цілком можна порівнювати з ефектом, який спостерігається при вбудовуванні мітохондріальних плазмід до мітохондріальної ДНК у процесі цитоплазматичної реверсії до фертильності,— підвищенням загального енергетичного рівня та життєздатності рослини. Слід відзначити, що як і у випадку наведеної в літературі цитоплазматичної реверсії, в наших експериментах головні зміни спостерігалися на рослинах, оброблених плазмідом, яка містила S2-послідовності мітохондріальної ДНК кукурудзи. Порівняння отриманих нами експериментальних результатів з даними Кембела з співавт. [21], які встановили

наявність у ядерній ДНК кукурудзи тільки копій структури S1 та відсутність S2-копій, дозволяє висунути припущення про те, що на рівні мітохондріальної та на рівні ядерної ДНК життєздатність рослинної клітини підвищується за умови вбудовування до них обох типів мітохондріальних плазмід.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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 cytoplasm of male sterile maize/D. R. Pring, C. S. Levings, W. W. G. Hu, D. H. Timothy//Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 7.—P. 2409—2908.
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 cytoplasm of maize//Nucl. Acids. Res.—1980.—8, N 9.—P. 1999—2008.
6. Schardl C. L., Pring D. R., Lansdale D. M. 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. Bfmo, 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  $\alpha$ -subunit of the  $F_1$ -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—1023.
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, R. D. Shillito, M. Saul et al.//Ibid.—1984.—3, N 12.—P. 2717—2722.
12. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric 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. Манягис 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.: 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.

Ин-т молекуляр. біології і генетики АН України,  
Київ

Одержано 14.10.91