



УДК 577.113+123.5

С. А. Мартынов, И. Г. Бух, С. С. Малюта

КЛОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДОПОДОБНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК КУКУРУЗЫ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД *

Получены гибридные плазмиды двух типов, содержащие S1- и S2- последовательности митохондриальных ДНК кукурузы линии ВИР 44МС. Первый тип включает фрагменты, а второй — полные последовательности с развернутыми инвертированными повторами в центре. Показано, что рекомбинантные плазмиды второго типа не являются АРП-элементами для дрожжей. При введении гибридных плазмид в интактные растения кукурузы обнаруживаются низкомолекулярные фракции в ДНК митохондрий.

Введение. За последние годы появилось большое количество работ, посвященных изучению структурно-функциональных особенностей внеядерных геномов высших растений. Исследованию митохондриального генома растений, как одной из этих систем, уделяется особое внимание, поскольку накоплено большое количество данных о связи митохондрий с целым рядом практически важных свойств, таких как адаптационная изменчивость, устойчивость к патотоксинам и химическим стрессовым факторам, цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) и др. [1, 2]. При формировании ЦМС, проявляющейся в наследственной дегенерации пыльцы на определенном этапе микроспорогенеза, наблюдаются сложные взаимодействия генома ядра и цитоплазмы. Подтверждением такого взаимодействия является обнаруженная гомология между последовательностями ДНК митохондрий, хлоропластов и ядер [3]. Одним из интереснейших аспектов изучения ЦМС является ее связь с наличием в митохондриях растений наряду с высокомолекулярной ДНК во многих, хотя и не во всех, случаях плазмидоподобных кольцевых и линейных молекул ДНК размером от 1 до 10 т.п.н. [4]. Такие ДНК найдены в митохондриях кукурузы, сорго, конских бобов, лука, подсолнечника, петунии и др. [5—10]. Для кукурузы, генетика ЦМС которой изучена наиболее детально, характерно наличие трех типов стерильности: T, C, S. Митохондриальная ДНК S-типа характеризуется присутствием двух плазмид, названных S1 и S2, имеющих размеры 6,4 и 5,4 т.п.н. соответственно. Транспозоноподобная структура этих эпизомов, а также другие структурно-функциональные особенности предполагают их участие в рекомбинационных событиях, являющихся причиной перестроек в митохондриальной ДНК, что в свою очередь и приводит к появлению ЦМС у растений [11].

Целью данного исследования является изучение структурных изменений митохондриального генома кукурузы при взаимодействии с соз-

* Представлена членом редколлегии В. А. Кордюмом.

данными нами гибридными плазидами, содержащими как фрагменты *S1*-, *S2*-последовательностей, так и оригинальные конструкции, имеющие в своем составе полные плазмидоподобные митохондриальные ДНК. Кроме того, нам представлялось интересным проверить клонированные структуры *S1* и *S2* на наличие в них последовательностей, способных к автономной репликации (АРП-элементы) в гетерологичной системе — клетках дрожжей.

Материалы и методы. В работе использовали фертильную линию кукурузы Вир 44 и ее ЦМС-аналог ВИР 44МС, полученные из Краснодарской опытной станции Всесоюз. Ин-та растениеводства.

Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* L-20 и плазмиды дрожжей *RB4*, *pYF40*, *Yip1* предоставлены сотрудниками отдела регуляторных механизмов клетки Ин-та молекуляр. биологии и генетики АН УССР. Остальные плазмиды и реципиентные штаммы бактерий взяты из коллекции отдела геной инженерии того же института.

Очистку и выделение митохондрий, получение из них препаратов митохондриальной ДНК проводили по методу Хэнсона [4].

S1- и *S2*-плазмидоподобные ДНК митохондрий кукурузы элюировали из 0,8% -ного агарозного геля с последующей трехкратной депротеинизацией смесью: фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (1:1:24).

Электронную микроскопию митохондриальной ДНК и *S1*, *S2* плазмидоподобных ДНК осуществляли по методу Дэвиса [12]. Трансформацию дрожжевых клеток в присутствии LiCl — по [13].

Реакции рестрикции, лигирования, ник-трансляции и блот-гибридизацию по Саузерну проводили, как описано в руководстве [14]; обработку растений кукурузы гибридными плазидами — согласно [15].

Результаты и обсуждение. Из кукурузы линии ВИР 44МС (мужскостерильная цитоплазма *S*-типа) был получен лизат митохондрий. При электронно-микроскопическом анализе лизата наряду с высокомолекулярными фрагментами нами были обнаружены два типа кольцевых молекул с контурной длиной 1,9 и 1,7 мкм (рис. 1). После фенольной депротеинизации и элюции из агарозного геля *S1*- и *S2*-последовательностей в препаратах присутствовали в основном линейные молекулы с контурными длинами 2,0 и 1,8 мкм соответственно. Согласно литературным данным [16, 17], кольцевая структура ДНК неочищенного лизата митохондрий может быть обусловлена наличием молекулы белка, ковалентно связанной с ней в области повторяющихся последовательностей.

В качестве вектора при конструировании рекомбинантных плазмид, содержащих *S1*- и *S2*-последовательности митохондриальной ДНК кукурузы, была использована плазида *pBR322*. На основе этого вектора получены плазмиды, содержащие фрагменты последовательностей *S1* и *S2* (плазмиды I типа). Одна из рекомбинантных плазмид I типа — *pZMS8* — содержит фрагмент *S1*-последовательности от уникального сайта *SalGI* и включает область гомологии с *S2*-последовательностью около 5 392 п.о. Вторая плазида — *pZMH65* — содержит фрагмент *S2*-последовательности от уникального сайта *HindIII* до конца плазмиды с областью гомологии со структурой *S1* около 3600 п.о. Для обеих плазмид характерно наличие открытой рамки считывания URF-2 (1017 п.о.), что соответствует 339 аминокислотным остаткам. А у плазмиды *pZMS8* в клонированной последовательности присутствует открытая рамка считывания URF-4 (768 п.о.), что соответствует 256 аминокислотным остаткам [18].

Транспозоноподобная структура *S1*- и *S2*-последовательностей митохондриальной ДНК кукурузы, а именно: наличие в их составе на концах длинных инвертированных повторов предполагает существование возможных механизмов интеграции в ядерную или митохондриальную ДНК. Вероятность такого события явилась предпосылкой для кон-

струирования рекомбинантных плазмид, в которых бы присутствовали инвертированные повторы в общей структуре плазмиды. При конструировании плазмид такого типа (II тип плазмид) концы каждой клонируемой последовательности были лигированы, а полученные в результате кольцевые формы рестрицированы по одиночным сайтам *SalI* и *HindIII* для *S1*- и *S2*-структур соответственно. Развернутые линейные молекулы, содержащие в центре по два инвертированных повтора,

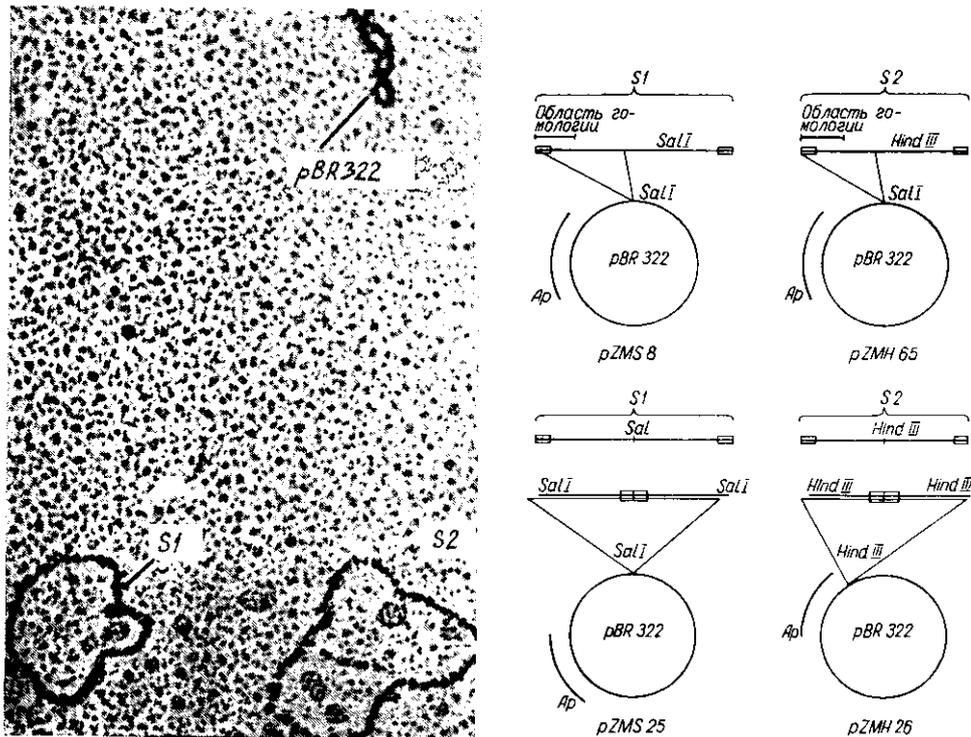


Рис. 1. Электронограмма препаратов *S1* и *S2* плазмидоподобных митохондриальных ДНК кукурузы (в качестве репера использована ДНК плазмиды *pBR322*)

Fig. 1. Electron microscopic photo of *S1* and *S2* plasmid-like mitochondrial DNAs from *Zea mays* (*pBR322* DNA has been used as a control molecule)

Рис. 2. Схема получения рекомбинантных плазмид, содержащих *S1*- и *S2*-последовательности митохондриальных ДНК кукурузы

Fig. 2. A flow chart of production of recombinant plasmids containing *S1*- and *S2*-sequences from mitochondrial maize DNA

примыкающих друг к другу, были встроены в *pBR322* по указанным сайтам. Схема конструирования гибридных плазмид I и II типа и их рестрикционный анализ представлены на рис. 2 и 4.

Опыт создания гибридных плазмид, имеющих в своем составе развернутые *S1*- и *S2*-молекулы с двумя инвертированными повторами в центре, показал их отличие от плазмид с фрагментами *S1*- и *S2*-последовательностей не только структурно, но и по ростовым характеристикам содержащих их бактериальных культур. Так, например, в плане физиологических признаков отмечался слабый рост всех 24 полученных клонов, содержащих последовательности митохондриальной ДНК кукурузы в жидкой питательной среде. В связи с этим наработку биомассы этих клонов проводили на чашках Петри с последующим смыыванием бактериального газона. Отличие таких плазмид по ростовым характеристикам бактериальных клеток, их содержащих, наводит на мысль, что присутствие в плазмиде двух лигированных разнонаправленных повторов, принадлежащих концам *S1*- и *S2*-последовательностей, затрудняет репликацию гибридной молекулы. Одним из возможных объясне-

ний такого явления могла бы оказаться инициация репликации в области инвертированных повторов и столкновение репликативных комплексов, движущихся навстречу друг другу со стороны инвертированного повтора и области инициации репликации векторной части плазмиды

pBR322. Именно поэтому представлялось целесообразным проверить способность *S1*-, *S2*-митохондриальных плазмид иницировать репликацию в гетерологичных для них системах, в частности, в клетках дрожжей. С этой целью мы сконструировали рекомбинантные плазмиды *pYF40S1* и *Yip1S2*, (рис. 3), не имеющие области инициации репликации для клеток дрожжей. О наличии автономно реплицирующихся последовательностей (АРП-элементы) судили по эффективности трансформации клеток дрожжей рекомбинантными плазмидами со встроенными *S1*- и *S2*-последовательностями митохондриальных ДНК кукурузы. Согласно литературным данным, присутствие АРП в гибридных

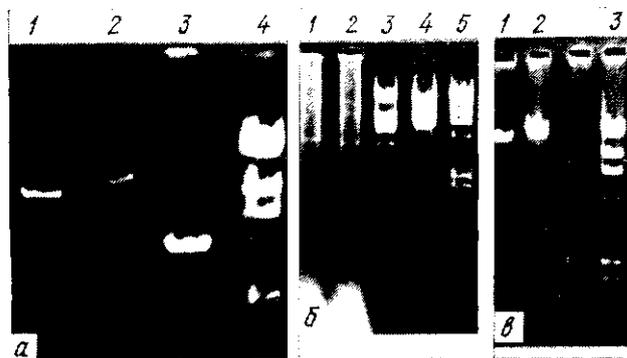
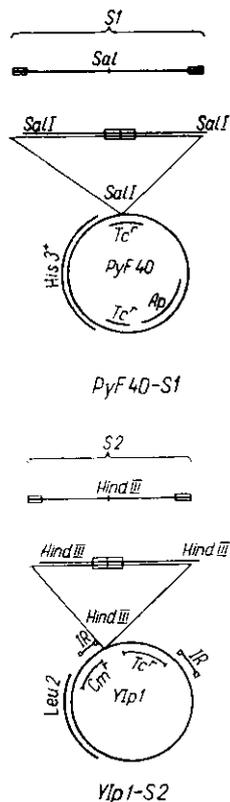


Рис. 3. Схема получения рекомбинантных плазмид на основе дрожжевых векторов, содержащих *S1*- и *S2*- последовательности ДНК кукурузы

Fig. 3. A flow chart of production of recombinant plasmids using yeast vectors, containing *S1*- and *S2*-maize DNA sequences

Рис. 4. Электрофореграммы препаратов ДНК гибридных плазмид, обработанных рестриктазами: а — плазида *pZMH65* — обработка *SalGI* (1); *pZMS8* — *BamHI* (2); *pBR322* — *BamHI* (3); ДНК бактериофага λ — *HindIII* (4); б — плазида *pZMS25* — обработка *SalGI* (1); *pZMH26* — *HindIII* (2); ДНК бактериофага λ — *EcoRI* (3); ДНК бактериофага λ — *BamHI* (4); ДНК бактериофага λ — *HindIII* (5); в — плазида *pZMS25* — обработка *BamHI* (1); *pZMS26* — *SalGI* (2); ДНК бактериофага λ — *HindIII* (3)

Fig. 4. Electrophoregrams of restricted hybrid plasmid DNAs: а — *pZMH65* plasmid after *SalGI* treatment (1); *pZMS8* — *BamHI* (2); *pBR322* — *BamHI* (3); λ phage DNA — *HindIII* (4); б — *pZMS25* plasmid after *SalGI* treatment (1); *pZMH26* — *HindIII* (2); λ phage DNA — *ECORI* (3); λ phage DNA — *BamHI* (4); λ phage DNA — *HindIII* (5); в — *pZMS25* plasmid after *BamHI* treatment (1); *pZMS26* — *SalGI* (2); λ phage DNA — *HindIII* (3)

плазмидах обеспечивает повышение эффективности трансформации клеток дрожжей в десятки и сотни раз [19]. Это и было предпосылкой к использованию для наших целей разработанной системы трансформации клеток дрожжей, обработанных солями щелочных металлов [13]. Контролем уровня трансформации служила двурепликонная плазида *RB4*, имеющая область инициации репликации как кишечной палочки, так и дрожжей. Данные проведенных экспериментов по трансформации приведены в таблице. Как можно видеть из полученных данных, рекомбинантные плазмиды *pYF40S1* и *Yip1S2* не трансформируют клеток дрожжей, т. е. при данной конструкции *S1*- и *S2*-структуры ми-

тохондриальной ДНК, встроенные в векторы для клеток дрожжей, не осуществляют функции автономно реплицирующихся последовательностей.

Для того чтобы установить, влияет ли обработка кукурузы гибридными плазмидами на состояние ее ДНК, мы предприняли попытку проследить судьбу этих плазмид в митохондриях растений. При исследовании митохондриальной ДНК, выделенной из линии кукурузы

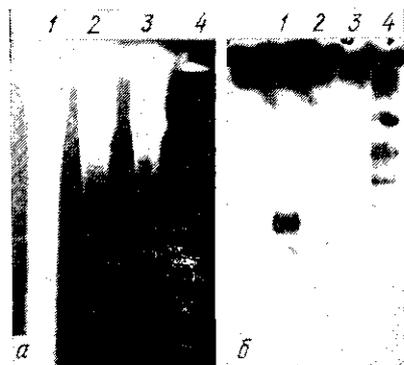


Рис. 5. Электрофоретический (а) и гибридационный (б) анализ ДНК митохондрий кукурузы: 1 — митохондриальная ДНК кукурузы ВРР 44 — вариант обработки растений S2-содержащей плазмидой; 2 — то же, но S1-содержащей плазмидой; 3 — митохондриальная ДНК кукурузы ВРР 44; 4 — плазмида *pZMH65*

Fig. 5. Analysis of maize mitochondrial DNAs using electrophoresis (a) and hybridization (b): 1 — mitochondrial DNA of maize *BUP44* — from S2-plasmid-treated plants; 2 — the same object treated by S1-plasmid, 3 — mitochondrial DNA of maize *BUP 44*; 4 — *pZMH65* plasmid

ВРР 44 (фертильный вариант), обработанной гибридными плазмидами (плазмиды I типа), мы обнаружили ряд изменений. На рис. 5 представлены данные экспериментов по блот-гибридации препаратов митохондриальной ДНК из контрольных и опытных, обработанных гибридными плазмидами с S1- и S2-последовательностями, растений кукурузы. Из результатов следует, что митохондриальная ДНК из контрольного варианта растений не содержит свободных плазмидоподобных структур, в то время как в опытных вариантах наблюдается появление фрагментов, гибридизующихся с зондом (плазмида *pZMH65*, меченная [³²P] СТР) и приблизительно соответствующих по молекулярной массе S1- и S2-последовательностям митохондриальной ДНК кукурузы.

Итак, результаты проведенных исследований показывают, что, с одной стороны, S1- и S2-последовательности ДНК митохондрий кукурузы в составе бактериальных векторов не обладают свойствами автономно реплицирующихся структур (данные по трансформации клеток дрожжей), что, казалось бы, не свидетельствует в пользу наличия в них области инициации репликации; с другой стороны, гибридные плазмиды, вероятно, обладают способностью к репликации в митохондриях (данные блот-гибридации). Последнее обстоятельство согласуется с данными других авторов [20], которые на интактных митохондриях проростков кукурузы показали не только способность к репликации, но и наличие определенной матричной активности бактериальных векторов.

Дальнейшие исследования в этом направлении могут оказаться одним из подходов к изучению некоторых аспектов структурно-функциональных особенностей митохондриального генома растений.

Эффективность трансформации реципиентных клеток дрожжей и кишечной палочки рекомбинантными плазмидами

Transformation efficiency of yeast and *E. coli* recipient cells by recombinant plasmids

Штамм	Плазмида	Селективный маркер	Число трансформантов на 1 мкг ДНК
<i>E. coli</i>	<i>pYF40</i>	Ap	$3,4 \cdot 10^4$
	<i>pYF40S1</i>	Ap	$1,8 \cdot 10^4$
	<i>YIp1</i>	Cm	$3,7 \cdot 10^3$
	<i>YIpS2</i>	Cm	$8,8 \cdot 10^3$
	<i>RB4</i>	Ap	$5,3 \cdot 10^3$
<i>S. cerevisiae</i>	<i>pYF40</i>	his	$3,7 \cdot 10^4$
	<i>pYF40S1</i>	his	0
	<i>YIp1</i>	leu	$2 \cdot 10^4$
	<i>YIpS2</i>	leu	0
	<i>RB4</i>	leu	$1,6 \cdot 10^3$

ВРР 44 (фертильный вариант), обработанной гибридными плазмидами (плазмиды I типа), мы обнаружили ряд изменений. На рис. 5 представлены данные экспериментов по блот-гибридации препаратов митохондриальной ДНК из контрольных и опытных, обработанных гибридными плазмидами с S1- и S2-последовательностями, растений кукурузы.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERS OF PLASMID-LIKE MITOCHONDRIAL MAIZE DNA

S. A. Martynov, I. G. Bukh, S. S. Malyuta

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Hybrid plasmids of two types containing S1 and S2-sequences of mitochondrial maize var. BUP 44 MC are obtained. The first type contains fragments, and the second one — the full sequences with the inverted repeated sequences in the centre of molecules. Recombinant plasmids of the second type have been shown not to be ARS-elements for yeast cells. While introducing hybrid plasmid into intact maize plants the low-weight fractions are found in mitochondrial DNA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mitochondrial sensitivity to Drechstera maydis T-toxin and synthesis of a variant mitochondrial polypeptide in plants derived from maize tissue culture with texas male-sterile cytoplasm* / L. K. Dixon, C. J. Leaver, R. I. S. Brettell et al. // *Theor. and Appl. Genet.*— 1982.— 63, N 1.— P. 75—80.
2. *Levings C. S., III. Cytoplasmic male sterility* // *Genet. eng. of plants: Agr. perspect. proc. symp.*— New York; London, 1983.— P. 81—92.
3. *Kemble R. J., Mans R. J., Gabay-Laughman S.* Sequences homologous to episomal mitochondrial DNAs in the maize nuclear genome // *Nature.*— 1983.— 304.— P. 744—747.
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. *Laughman F. R., Gabay-Laughman S.* Cytoplasmic male sterility in maize // *Ann. Rev. Genet.*— 1983.— 17.— P. 24—48.
6. *Chase C. D., Pring D. R.* Circular plasmid DNAs from mitochondria of sorghum bicolor // *Plant. Mol. Biol.*— 1985.— 5, N 5.— P. 303—312.
7. *Mitochondrial plasmid-like molecules and male sterile Vicia faba L.* / J. Golbet, M. Boutry, G. Duc, M. Briquet // *Ibid.*— 1983.— 2, N 5.— P. 305—309.
8. *Holford P., Newbury H. J., Groft J. H.* Differences in the mitochondrial DNA of male-fertile, *cms-S* and *cms-T* onions // *Eucarpia-Sec. Vegetables: Proc. 4th Allium Symp.* (Coventry, 6—9 Sept., 1988).— Wellesbourne, 1988.— P. 205—211.
9. *Sequence of a mitochondrial plasmid of sunflower and its relationship to other mitochondrial plasmids* / C. Perez, B. Dujon, P. Heizman, S. Berville // *Plant Sci.*— 1988.— 58, N 1.— P. 59—69.
10. *Hanson M. R., Young E. G., Rothenberg M.* Sequence and expression of a fused mitochondrial gene, associated with *Petunia* cytoplasmic male sterility, compared with normal mitochondrial genes in fertile and sterile plants // *Phil. Trans. Roy. Soc. London B.*— 1988.— 319, N 1193.— P. 199—208.
11. *Brendel V., Segel L. A.* On modes of recombination, replication, and segregation of the higher plant mitochondrial genome // *J. Theor. Biol.*— 1987.— 125, N 2.— P. 163—176.
12. *Davis R., Simon M., Davidson N.* Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequences homology in nucleic acids // *Meth. Enzymol.*— 1971.— 21.— P. 413—428.
13. *Transformation of intact yeast cell treated with alkali cations* / H. Ito, G. Fucuda, K. Murata et al. // *J. Bacteriol.*— 1983.— 153, N 1.— P. 163—169.
14. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
15. *Ohia Y.* High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 2.— P. 715—719.
16. *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.
17. *Electron microscopy study of the plasmid-like DNAs of maize mitochondria* / R. H. Meints, W. Hu, A. Schuster et al. // *Maydica.*— 1989.— 34, N 3.— P. 197—205.
18. *Pillard M., Sederoff R. R., Levings C. S.* Nucleotide sequence of the S1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize // *The EMBO J.*— 1985.— 4, N 5.— P. 1125—1128.
19. *Patzhill T. G., Oliver S. G., Newton C. S.* DNA sequence analysis of ARS elements from chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae* identification of a new conserved sequence // *Nucl. Acids Res.*— 1986.— 14, N 15.— P. 6247—6264.
20. *Синтез ДНК в интактных митохондриях кукурузы, обработанных бактериальными векторными плазмидами серии pBR/Ю. М.* Константинов, Н. В. Подсосонный, Г. Н. Луценко, М. И. Ривкин // *Биополимеры и клетка.*— 1989.— 5, № 4.— С. 98—102.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 10.05.90