

MOLEKULARNA IDENTYFIKACJA CZYNNIKÓW CYTOPLAZMATYCZNEJ MĘSKIEJ STERYLNOŚCI ROŚLIN

Marek Szklarczyk

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja

U roślin znanych jest wiele niezależnych mutacji wywołujących męską sterylność, czyli niezdolność do produkcji funkcjonalnego pyłku [HANSON 1991; SCHNABLE, WISE 1998]. Wiele z tych mutacji nie wykazuje dziedziczenia Mendlowskiego – są one dziedziczone cytoplazmatycznie lub cytoplazmatycznie-genowo i klasyfikowane jako przejawy tzw. cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS). Występowanie zjawiska CMS stwierdzono u ponad 140 gatunków roślin, w tym ważnych gospodarzo, jak: kukurydza, żyto, sorgo, słonecznik, rzepak, burak, marchew i cebula. Zainteresowanie cechą CMS wynika z jej przydatności w praktycznej hodowli roślin. Formy męskosterylne są używane jako komponenty mateczne do produkcji nasion mieszańcowych.

Biorąc pod uwagę mateczne dziedziczenie cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS), od początku upatrywano determinant tej cechy w genomie mitochondrialnym bądź plastydowym. Udział plastydów w ekspresji CMS został wykluczony po eksperymentach, w których poddawano somatycznej hybrydyzacji formy płodne i sterylne [HANSON 1991]. W wyniku fuzji protoplastów plastydy form wyjściowych ulegają zwykle segregacji w taki sposób, że rośliny hybrydowe posiadają DNA plastomu (cpDNA) po jednej bądź drugiej formie rodzicielskiej. Często zdarzało się, że cpDNA płodnego rodzica odnajdywano u sterylnego mieszańca somatycznego, a cpDNA sterylnego rodzica u płodnej rośliny hybrydowej. Zgodnie z opisanymi obserwacjami wszystkie znalezione dotychczas sekwencje, wykazujące korelację z CMS, pochodzą z mitochondrialnego DNA (mtDNA). Często posiadają one charakter chimeryczny – są złożone z fragmentów znanych genów i odcinków nieznanego pochodzenia. Sekwencje takie powstają w wyniku rekombinacji, niejednokrotnie jako rezultat wielu zdarzeń rekombinacyjnych [MACKENZIE i in. 1994; VEDEL i in. 1994].

Najlepiej poznane są podstawy CMS wywoływanej przez cytoplazmę Texas (T) kukurydzy (*Zea mays*) [LEVINGS, SIEDOW 1992]. MtDNA roślin z cytoplazmą T zawiera specyficzną otwartą ramkę odczytu *T-urf13*, która jest złożona z: 88 kodonów o homologii z regionem flankującym od strony 3' gen *rrn26*, 8 kodonów nieznanego pochodzenia i 18 kodonów o homologii do części kodującej genu *rrn26*. Przed (ang. upstream) *T-urf13* znajduje się sekwencja wykazująca podobieństwo do regionu flankującego od strony 5' gen *atp6*, co sugeruje, że oba te geny posiadają podobne promotory. Zaobserwowano, iż geny przywracające płodność zmieniają akumulację transkryptu *T-urf13* i kodowanego przez niego białka

URF13. Jest to białko transmembranowe, posiadające zdolność tworzenia oligomerów formujących kanał penetrujący wewnętrzną błonę mitochondrialną. Otrzymane w kulturach *in vitro* rośliny, wykazujące rewersję do płodności, charakteryzowały się mutacjami regionu *T-urf13*.

W mtDNA męskosterylnej cytoplazmy PET1 słonecznika (*Helianthus annuus*) znaleziono za genem *atpA* otwartą ramkę odczytu o długości 522 pz. Powstała ona w wyniku insercji fragmentu DNA o wielkości 5 kpz, otoczonego odwróconymi powtórzeniami o długości 261 pz [HORN i in. 1995]. Region ten zidentyfikowano na podstawie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism – RFLP) otrzymanego przy użyciu sondy *atpA* dla płodnych i sterylnych linii. Pierwsze 57 pz sekwencji *orf522* wykazuje homologię z genami *orfB*, pozostała część ma charakter unikalny. Poziom transkryptu *orf522* i odpowiadającego mu białka obniża się w męskich częściach kwiatów pod wpływem przywrócenia płodności.

Związek specyficznej sekwencji mitochondrialnego DNA z fenotypem CMS stwierdzono także w przypadku petunii (*Petunia hybrida*) [HANSON 1991]. Rośliny mieszańcowe powstałe w wyniku hybrydyzacji komórek somatycznych roślin linii CMS i płodnej segregowały pod względem cechy męskiej sterility. W toku analizy RFLP zidentyfikowano region mtDNA, charakterystyczny dla genomu sterylnego rodzica i sterylnych roślin mieszańcowych. Sekwencja ta, określana obecnie jako *S-Pcf*, zawiera trzy sąsiadujące otwarte ramki odczytu. Pierwsza z nich – *pcf* (ang. *Petunia CMS-associated fused*) – posiada charakter chimeryczny i jest złożona z fragmentów kilku genów:

- 1) 35 kodonów identycznych z fragmentem genu *atp9*;
- 2) 4 kodonów powstałych prawdopodobnie w wyniku rekombinacji z genem *cox2*;
- 3) 158 kodonów zawierających fragmenty obydwu egzonów genu *cox2*;
- 4) 205 kodonów o nieznannej homologii (*urf-S*).

Kolejne dwie otwarte ramki odczytu locus *S-Pcf* zawierają sekwencje genów *nad3* i *rps12*, które są kotranskrybowane z *pcf*. Normalne wersje genów *atp9* i *cox2* są obecne w innych miejscach genomu mitochondrialnego sterylnych form. Sekwencje *nad3* i *rps12* w locus *S-Pcf* stanowią jedyne kopie tych genów obecne w genomie roślin CMS. U linii płodnych sekwencja *pcf* nie występuje, w związku z tym geny *nad3* i *rps12*, mimo podobieństwa do swoich odpowiedników z form CMS, znajdują się pod kontrolą innej sekwencji regulatorowej.

W mitochondriach roślin CMS petunii jest syntetyzowane białko o masie 25 kDa, którego ekspresji nie stwierdzono w mitochondriach form płodnych. Obecność tego białka wykazano przy zastosowaniu surowicy przeciwko peptydowi o sekwencji aminokwasowej odpowiadającej kolejności nukleotydów części regionu *urf-S*. Stwierdzono wysoki poziom ekspresji tego białka w tkance sporogonicznej i rozwijających się pylnikach sterylnych roślin. Spadek akumulacji białka o wielkości 25 kDa następuje pod wpływem wprowadzenia genu przywracającego płodność. Pomimo, iż fragmenty genu *cox2* wchodzi w skład sekwencji *pcf*, przeciwciała anti-COX2 nie rozpoznają białka o wielkości 25 kDa, co sugeruje, że powstaje ono w wyniku rozpadu większego prekursora. Występowanie takiego prekursora zostało udowodnione [NIVISON i in. 1994], posiada on masę 43 kDa, a jego sekwencja aminokwasowa odpowiada całej sekwencji genu *pcf*. Białka o wielkości 43 i 25 kDa występują w roztworze lub luźnej asocjacji z błonami. Akumulacji w mitochondriach podlega jedynie drugie z tych białek.

U rzepaku (*Brassica napus*) zidentyfikowano kilka sekwencji wykazujących związek ze zjawiskiem CMS. Polimorfizm profili transkrypcyjnych genu *atp6* umożliwił identyfikację charakterystycznego dla cytoplazmy Polima (pol) locus *orf224/atp6*. Gen *orf224* ma strukturę chimeryczną – część 5' sekwencji kodującej wykazuje homologię z roślinnymi genami *orfB*, pochodzenie pozostałego fragmentu jest nieznane [SINGH, BROWN 1991]. Rośliny z restorcerami *Rfp1* i *Rfp2* wykazywały zróżnicowaną obróbkę kotranskryptu *orf224/atp6* [SINGH i in. 1996]. Sekwencja aminokwasowa, określona dla ORF224 na podstawie kolejności nukleotydów DNA, wykazuje 79% homologii do analogicznie wydedukowanej sekwencji białka ORF222, które jest produktem ekspresji regionu *orf222/nad5c/orf139* z mtDNA cytoplazmy napus (nap) [L'HOMME i in. 1997]. Na korelację tego regionu z CMS wskazują ilościowe i jakościowe różnice w akumulacji jego transkryptów, występujące w zależności od obecności lub braku genów przywracających płodność. W cytoplazmie Ogura (ogu) występuje unikalny gen *orf138*. Znalaziono go we fragmencie restrykcyjnym, który był specyficzny dla mtDNA męskosterylnych roślin cybrydowych, nie występował natomiast u płodnych rewertantów [BONHOMME i in. 1992]. Obecność restorera *Rfo* redukuje akumulację białka ORF138 [GRELON i in. 1994].

Mitochondria sterylnej cytoplazmy Bo ryżu (*Oryza sativa*) zawierają dwie kopie genu *atp6*. Za jedną z nich zlokalizowano gen *orf79*. Restorer *Rf1* wpływa na obróbkę i redagowanie kotranskryptu *atp6/orf79* [AKAGI i in. 1995; IWABUCHI i in. 1993].

Z. CMS u sorga (*Sorghum bicolor*) jest związany gen *orf107* złożony z fragmentu o homologii z częścią 5' genów *atp9* oraz odcinka o homologii ze wspomnianym wyżej genem *orf79* sterylnej cytoplazmy ryżu [TANG i in. 1996].

Korelację z CMS u fasoli (*Phaseolus vulgaris*) wykazuje fragment genomu mitochondrialnego oznaczony *pvs* i zawierający m.in. unikalną otwartą ramkę odczytu *orf239* [JAŃSKA 1997]. Stwierdzono, że przywrócenie płodności działaniem genu *Fr* oraz spontaniczne rewersje do płodności (zachodzą z wysoką częstością w tym systemie) są związane z fizyczną utratą chromosomu zawierającego sekwencję *pvs*. Drugi z restorerów *Fr2* eliminuje akumulację białka ORF239. W obecności *Fr2* gen *Fr* nie powoduje usunięcia chromosomu z sekwencją *pvs*. Wynika z tego, że kierowana restorerem *Fr* zmiana struktury genomu mitochondrialnego jest zależna od prawidłowej ekspresji regionu *pvs*. Transgeniczne rośliny tytoniu, wykazujące ekspresję *orf239*, przejawiały fenotyp męskosterylny lub częściowo męskosterylny [HE i in. 1996].

Specyficzne cechy organizacji i ekspresji genu *atp9* u sterylnych marchwi (*Daucus carota*) typu petaloidalnego [SZKLARCZYK 1997] skłoniły do bliższej charakterystyki tej sekwencji [SZKLARCZYK i in. 2000]. Wyizolowano gen *atp9* zarówno z form petaloidalnych, jak również męskopłodnych. Poszczególnym wersjom tego genu nadano oznaczenia odpowiednio *atp9-1* i *atp9-3*. W ORF genu *atp9-3* brakuje 13 C-terminalnych kodonów aminokwasowych obecnych w sekwencji *atp9-1*. Różnica ta jest konsekwencją substytucji nukleotydowej w pozycji 229 odpowiednich otwartych ramek odczytu. Przy końcu 3' genu *atp9-3* występuje duplikacja jednostki sekwencyjnej o długości 42 pz. Wyizolowano także klon zawierający gen, dla którego przyjęto oznaczenie *atp9-2*. Jego otwarta ramka odczytu jest prawie o połowę krótsza od ORF genu *atp9-1*. Wyniki PCR wskazują, że obecność sekwencji *atp9-2* nie wykazuje korelacji z CMS. *Atp9-2* wykazuje cechy pseudogenu. Wykazano również, że specyficzne dla petaloidów mRNA genu *atp9* są rezultatem jego kotranskrypcji z sekwencją *rnm5*.

Sekwencje odpowiedzialne za ekspresję cechy CMS u cebuli (*Allium cepa*) nie są znane. Pomimo tego w roku 1995 doniesiono o opracowaniu markera typu PCR dla potrzeb identyfikacji rodzaju cytoplazmy [HAVEY 1995]. Marker ten pozwala odróżnić rośliny z cytoplazmą N i S na podstawie polimorfizmu plastydowego DNA. Kolejny marker PCR, pozwalający na rozróżnienie roślin z cytoplazmą N i S, opracował SATO [1998]. Wykorzystuje on zmienioną organizację mitochondrialnego locus *S-cob*. Przydatność tych markerów w pracach selekcyjnych udowodnili ostatnio SZKLARCZYK i in. [2002]. Pozwoliły one przede wszystkim wychwycić przypadki obecności roślin z cytoplazmą S w obrębie materiałów typowanych na linie dopełniające.

W większości przypadków sekwencje związane z CMS nie wykazują wzajemnych podobieństw. Do wyjątków należą *orf222* cytoplazmy napus i *orf224* cytoplazmy Polima rzepaku (*B. napus*) oraz *orf107* cytoplazmy A3 sorgo (*S. bicolor*) i fragment genu *orf79* cytoplazmy Bo ryżu. Cechą wspólną wielu sekwencji wykazujących korelację z CMS jest to, że kodują one białka zawierające duże domeny hydrofobowe. Sugeruje to, że mechanizm działania tych białek może być związany z ich zakotwiczeniem w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [MACKENZIE i in. 1994].

Restorer CMS fasoli (*Ph. vulgaris*) jest jedynym znanym genem przywracającym płodność poprzez fizyczne usunięcie mitochondrialnej determinanty sterylności. Przyjmuje się, że większość innych restorerów działa na poziomie transkryptów mitochondrialnych sekwencji CMS poprzez ich:

- 1) obróbkę, znajdującą odzwierciedlenie w poziomie akumulacji oraz/lub
- 2) redagowanie, które może zmieniać efektywną długość części kodującej genu przez wprowadzenie nowych kodonów *start* i *stop* [SCHNABLE, WISE 1998].

Dotychczas poznano sekwencję DNA jednego restorera – jest nim *Rf2* przywracający płodność roślinom kukurydzy z cytoplazmą T. Hipotetyczna sekwencja aminokwasowa *RF2* wykazuje podobieństwo do mitochondrialnych dehydrogenaz aldehydowych ssaków [CUI i in. 1996]. Mechanizm działania *RF2* nie został jeszcze poznany. Według hipotezy „metabolicznej” białko *URF13*, odpowiedzialne za wystąpienie cechy CMS, zmienia funkcję mitochondriów tak, że produkowane są dodatkowe aldehydy, których utlenianie przez *RF2* ma funkcje detoksykacyjne. Alternatywna hipoteza „interakcyjna” zakłada bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie białka *RF2* z *URF13*. Mogłoby się to odbywać np. poprzez utlenianie aldehydowego składnika wewnętrznej błony mitochondrialnej [SCHNABLE, WISE 1998].

Literatura

- AKAGI H., NAKAMURA A., SAWADA R., OKA M., FUJIMURA T. 1995. *Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile cybrid plants of rice*. Theor. Appl. Genet. 90: 948–951.
- BONIOMME S., BUDAR F., LANCELIN D., SMALL I., DEFRANCE M.C., PELLETIER G. 1992. *Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in Brassica cybrids*. Mol. Gen. Genet. 235: 340–348.
- CUI X.Q., WISE R.P., SCHNABLE P.S. 1996. *The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile, T-cytoplasm maize*. Science 272: 1334–1336.

- GRELON M., BUDAR F., BONHOMME S., PELLETIER G. 1994. *Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids*. Mol. Gen. Genet. 243: 540-547.
- HANSON M.R. 1991. *Plant mitochondrial mutations and male sterility*. Annu. Rev. Genet. 25: 461-486.
- HAVEY M.J. 1995. *Identification of cytoplasmic lines using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion*. Theor. Appl. Genet. 90: 263-268.
- HE S., ABAD A.R., GELVIN S.B., MACKENZIE S. 1996. *A cytoplasmic male sterility-associated protein causes pollen disruption in transgenic tobacco*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11763-11768.
- HORN R., KÖHLER R.H., LÖSSL A., KRÄUTER R., GERLACH J.R., HUSTEDT J.E.G., HAHN V., HAIN T., ZETSCHKE K., FRIEDT W. 1995. *Development and molecular analysis of alloplasmic male sterility in sunflower, w: Genetic mechanisms for hybrid breeding*. Kück U., Wricke G. (red.). Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin: 89-110.
- IWABUCHI M., KYOZUKA J., SHIMAMOTO K. 1993. *Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial atp6 RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice*. EMBO J. 12: 1437-1446.
- JAŃSKA H. 1997. *Organizacja i zmienność genomu mitochondrialnego roślin wyższych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego.
- L'HOMME Y., STAHL R.J., LI X.Q., HAMEED A., BROWN G.G. 1997. *Brassica nap. cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated orf224 gene*. Curr. Genet. 31: 325-335.
- LEVINGS C.S., SIEDOW J.N. 1992. *Molecular basis of disease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize*. Plant Mol. Biol. 19: 135-147.
- MACKENZIE S., HE S., LYZNIK A. 1994. *The elusive plant mitochondrion as a genetic system*. Plant Physiol. 105: 775-780.
- NIVISON H.T., SUTTON C.A., WILSON R.K., HANSON M.R. 1994. *Sequencing, processing, and localization of the petunia CMS-associated mitochondrial protein*. Plant J. 5: 613-623.
- SATO Y. 1998. *PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (Allium cepa L.)*. Theor. Appl. Genet. 96: 367-370.
- SCHNABLE P.S., WISE R.P. 1998. *The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration*. Trends Plant Sci. 3: 175-180.
- SINGH M., BROWN G.G. 1991. *Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region*. Plant Cell 3: 1349-1362.
- SINGH M., HAMEL N., MENASSA R., LI X.Q., YOUNG B., JEAN M., LANDRY B.S., BROWN G.G. 1996. *Nuclear genes associated with a single Brassica CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions*. Genetics 143: 505-516.
- SZKLIARCZYK M. 1997. *Unique features of carrot mtDNAs from CMS and maintainer lines*. J. Appl. Genet. 38A: 42-56.

SZKLARCZYK M., OCZKOWSKI M., AUGUSTYNIAK H., BÖRNER T., LINKE B., MICHALIK B. 2000. *Organisation and expression of mitochondrial atp9 genes from CMS and fertile carrots*. Theor. Appl. Genet. 100: 263–270.

SZKLARCZYK M., SIMLAT M., JAGOSZ B., BA G. 2002. *Use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding*. Cell Mol. Biol. Lett. 7: 625–634.

TANG H.V., PRING D.R., SHAW L.C., SALAZAR R.A., MUZA F.R., YAN B., SCHERTZ K.F. 1996. *Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum*. Plant J. 10: 123–133.

VEDEL F., PLA M., VITART V., GUTIERRES S., CHETRIT P., DE PAEPE R. 1994. *Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants*. Plant Physiol. Biochem. 32: 601–618.

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, CMS, genom mitochondrialny, mtDNA, geny chimeryczne

Streszczenie

Cecha cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) znalazła zastosowanie w hodowli roślin jako jeden z mechanizmów kontroli procesu zapyłania przy produkcji nasion mieszańcowych. Pod względem genetycznym CMS jest uwarunkowana wspólnym działaniem sterylnej cytoplazmy i specyficznych dla niej genów jądrowych. Dotychczasowe badania wskazują, że genetyczne determinanty CMS zlokalizowane są w genomie mitochondrialnym. Mają one charakter chimeryczny, tzn. są złożone z fragmentów znanych genów i odcinków nieznanego pochodzenia. Geny chimeryczne powstają w wyniku rekombinacji – niejednokrotnie jako rezultat wielu zdarzeń rekombinacyjnych. Kodują one białka zawierające duże domeny hydrofobowe – prawdopodobnie interferujące z funkcją wewnętrznej błony mitochondrialnej. Równoległe z badaniami podstawowymi prowadzone są eksperymenty zmierzające do opracowania markerów molekularnych dla identyfikacji poszczególnych cytoplazm hodowlanych. Można je wykorzystywać do eliminacji roślin z cytoplazmą sterylną z obiektów męskopłodnych oraz roślin z cytoplazmą płodną z obiektów męskosterylnych. Artykuł stanowi przegląd stanu wiedzy o molekularnych determinantach CMS u wybranych gatunków roślin.

MOLECULAR DETERMINANTS OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY IN PLANTS

Marek Szklarczyk

Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Science,
Agricultural University, Kraków

Key words: cytoplasmic male sterility, CMS, mitochondrial genome, mtDNA, chimeric genes

Summary

Cytoplasmic male sterility (CMS) has been widely used in hybrid seed production to control the process of pollination. CMS trait results from a joint action of a sterile cytoplasm and specific nuclear genes. Molecular determinants of CMS are located in the mitochondrial genome. They are often chimeric and consist of sequences of different origin. Such genes are created by recombination events and code for proteins that interfere with a function of the inner mitochondrial membrane. Some effort has been dedicated to identification of cytoplasmic DNA markers which can be exploited for selection purposes. This paper reviews current the knowledge on CMS determinants in selected plant species.

Dr Marek Szklarczyk
Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja
Al. 29 Listopada 54
31-425 KRAKÓW