

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЯДЕРНОЙ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ У РАСТЕНИЙ

А.Н. Палилова, П.А. Орлов, Е.А. Волуевич

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Минск, Беларусь,
e-mail: A.Palilova@igc.bas-net.by

В статье обобщаются результаты исследований, выполненных в Институте генетики и цитологии НАНБ по проблеме взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем в контроле процессов развития растений, формирования их устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды, грибным и вирусным патогенам. Отмечены наиболее важные и приоритетные разработки, которые легли в основу цикла работ, удостоенного Государственной премии Республики Беларусь в 2003 г.

Введение

Современная генетика – область биологической науки, в которой за последние 50 лет произошли крупнейшие открытия. Так, расшифрован генетический код и выяснены основные законы его функционирования, осуществлен синтез искусственных молекул наследственности ДНК и РНК, построены генетические карты бактерий, вирусов, многих растений и некоторых животных, разработаны методы выделения отдельных генов и способы передачи их другим организмам. Ученые вплотную приблизились к полной расшифровке генетической информации клетки растений, возможности управлять наследственностью и корректировать ее.

Однако до полного решения этих проблем еще далеко. Путь от гена до его проявления в виде отдельного признака сложен и почти не исследован. Предстоит понять и расшифровать механизмы регуляции экспрессии многих генов, пути их взаимодействия и последовательного «включения» в ходе развития и формирования признаков живых организмов. Усложняет решение этой проблемы многокомпонентность генотипа эукариотов, проявляющаяся в существовании нескольких генетических систем в клетках. Так, у растений ДНК содержится не только в ядре, в котором сосредоточена основная генетическая информация, но и

в других органеллах клетки – в митохондриях и хлоропластах. В этих органеллах имеются все компоненты, составляющие генетическую систему: ДНК, специфические РНК-полимеразы, информационные и транспортные РНК, рибосомы и др. Эти генетические системы взаимодействуют друг с другом и с ядерным геномом в процессах развития и формирования признаков и свойств растений.

Взаимодействие хлоропластных и ядерных генов отчетливо проявляется в важнейшем для растения процессе фотосинтеза. Многие белки, участвующие в этом процессе, в том числе один из важнейших ферментных белков рибулезодифосфаткарбоксилаза, контролируются ядерным и хлоропластным геномами. Можно привести много примеров двойного кодирования ферментных систем в клетках растений и животных, подтверждающих факты взаимодействия ядерных и органелльных геномов. Это общебиологическое явление характерно для эукариотических организмов, имеющих истинное ядро.

Существенный вклад в разработку проблемы взаимодействия ядерных и цитоплазматических генов в процессе формирования свойств и признаков растений внесли ученые Института генетики и цитологии НАН Беларуси, где по этому направлению исследований была создана научная школа во главе с доктором биологических наук, профес-

сором А.Н. Палиловой. Результаты, полученные за последние годы в трех лабораториях Института под руководством д.б.н. А.Н. Палиловой, д.б.н. Е.А. Волуевич и д.б.н. П.А. Орлова, вошли в цикл работ «Разработка фундаментальных и прикладных проблем взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем у растений», удостоенный Государственной премии Республики Беларусь в области науки и техники в 2003 г. Этот цикл работ отражает результаты исследований по основным направлениям фундаментальных и прикладных проблем взаимодействия генетических систем клеток сельскохозяйственных растений, выполненных под руководством этих исследователей.

Исследование взаимодействия ядерных генов и плазмогенов при ЦМС у сельскохозяйственных растений

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) у растений, открытая в пятидесятые годы 20-го века, нашла широкое применение в селекционной практике как генетический способ кастрации материнских растений гибридов кукурузы, пшеницы, риса, сахарной свеклы и др. Этот признак наследуется по материнской линии, что свидетельствует о его нехромосомной природе. Однако восстановление фертильности пыльцы у гибридов этого типа осуществляется ядерными генами-восстановителями фертильности. В этой связи одним из основных направлений, выбранных нами для изучения фундаментальных и прикладных проблем взаимодействия ядерной и цитоплазматических систем у растений, являлись генетическое, цитологическое, цитохимическое и биохимическое исследования взаимодействия ядерных генов и плазмогенов при ЦМС у растений (Турбин, Палилова, 1975).

Результаты исследований показали, что признак ЦМС является наиболее наглядным примером взаимодействия генов органелл с ядерным геномом клеток растений. Нарушение взаимодействия генетических систем клетки, вызванное мутациями в одной из них, приводит к стерильности пыльцы, ее нежизнеспособности. В случае, когда мутация происходит в митохондриальном гено-

ме, также возникает признак стерильности, но наследуется строго по материнской линии (ЦМС). На основе этих результатов впервые в мире была предложена теоретическая модель механизмов взаимодействия ядерных генов и плазмогенов при формировании ЦМС и восстановлении фертильности пыльцы (Палилова, 1986). Эта модель в дальнейших исследованиях была подтверждена на молекулярном уровне и получила широкое признание генетиков. Суть этой модели сводится к тому, что ЦМС является результатом мутации в митохондриальной ДНК, затрагивающей ген-регулятор, контролирующей синтез белка-репрессора, регулирующего этапы синтеза различных митохондриальных белков, которые обеспечивают нормальные функции митохондрий. Ядерный ген-восстановитель фертильности выполняет роль эффектора, контролирующего синтез белка-индуктора, связывающего репрессор и включающего последовательный синтез митохондриальных белков. В результате мутации в митохондриях нарушается нормальное взаимодействие ядерных генов и плазмогенов, что приводит к избыточному синтезу белка-репрессора и к отклонениям в функционировании митохондрий и стерилизации микроспор. Наличие в геноме растений доминантных аллелей ядерных генов восстановления фертильности компенсирует достаточное количество белка-индуктора и обеспечивает нормальный ход клеточного метаболизма в микроспорах пыльников.

Использование цитохимических и биохимических методов исследований показало также, что у ЦМС линий кукурузы, пшеницы и других культур отмечаются существенные изменения многих биохимических реакций: количественного содержания биологически активных и запасных веществ, аминокислот, активности ключевых ферментов клеточного метаболизма и других функций, что подтверждает влияние митохондриальной мутации на экспрессию многих генов.

Важное значение имеют результаты, полученные по этому направлению исследований, свидетельствующие о существовании гетерогенности митохондрий у растений с ЦМС и гетероплазматического состояния цитоплазмы по составу митохондрий в клетках растений, которое закреплено и переда-

ется по материнской линии в поколениях (Палилова, 1981).

Фундаментальные разработки проблемы взаимодействия ядерных и цитоплазматических генов при ЦМС у растений легли в основу ряда практических разработок. Так, были созданы линии с ЦМС у кукурузы, пшеницы, сахарной свеклы и линии – эффективные восстановители фертильности пыльцы, которые переданы в мировую коллекцию Всесоюзного института растениеводства (Санкт-Петербург), а также в другие селекционные учреждения. На основе лучших из линий кукурузы по комбинационной способности создан гибрид кукурузы Минский 1, который был районирован в Брестской и Гомельской областях Беларуси. Создана также гибридная популяция пшеницы на основе ЦМС и восстановителей фертильности, отличающаяся высоким гетерозисным эффектом.

Изучение взаимодействия генома и плазмона в формировании устойчивости растений к грибным и вирусным патогенам

Это направление исследований, вошедшее в цикл работ, удостоенных присуждения Государственной премии Республики Беларусь, является оригинальным, поскольку дает представление о формировании признака устойчивости к болезням на основе изучения взаимодействий генетических систем организмов различного биологического уровня развития.

На примере возбудителей таких распространенных и вредоносных грибных заболеваний пшеницы, как бурая ржавчина, мучнистая роса, септориоз, пыльная и твердая головня, выявлены эффекты генетических систем цитоплазмы растения-хозяина на полигенную устойчивость (Волуевич, Булойчик, 1999). Показано, что экспрессия малых генов устойчивости к этим патогенам обусловлена ядерным генетическим фоном и типом цитоплазмы. Обнаружено дифференцированное влияние цитоплазмы на экспрессию полигенов устойчивости на разных стадиях онтогенеза растения (Булойчик, Волуевич, 1998). Выявлена зависимость экспрессии преодоленных главных генов устойчивости

пшеницы к бурой ржавчине (*Lr10* и *Lr23*) от особенностей ядерного и цитоплазматического фона растения-хозяина и патогенных свойств изолятов гриба с использованием созданных нами новых серий аллоплазматических линий (Voluevich, Buloichik, 2001).

Установлено участие генетических цитоплазматических систем растения-хозяина в специфичности полигенной устойчивости пшеницы к грибным патогенам (Волуевич, Булойчик, 1995). Выявлено действие плазмона растения на адаптацию возбудителя болезни. Показано влияние цитоплазмы на толерантность (Волуевич, Лупей, 1999).

На основании этих теоретических разработок была сформулирована новая генетическая концепция устойчивости растений к грибным патогенам, учитывающая вклад в формирование этого признака каждой из генетических систем растения-хозяина и возбудителя болезни. Она предполагает взаимодействие всех трех генетических систем клеток растений (ядерной, хлоропластной и митохондриальной) в формировании реакций устойчивости-восприимчивости к патогенам.

Оригинальные результаты получены в ходе разработки механизмов устойчивости растений к вирусным болезням картофеля. Здесь также выявлена важная роль взаимодействия ядерных и органельных генов растения-хозяина с генами вирулентности и авирулентности вирусного патогена. На большом экспериментальном материале, полученном с использованием диких видов картофеля – доноров устойчивости к вирусам, сортов разного уровня устойчивости к этим патогенам и аллоплазматических линий картофеля, имеющих цитоплазму дикого вида *Solanum demissum*, показано изменение ультраструктуры хлоропластов и митохондрий при заражении X-, Y-, M-, S-вирусами (Павлючук и др., 1998). Методом эндонуклеазной рестрикции хлоропластных и митохондриальных ДНК выявлены фрагменты рестрикции, которые могут быть использованы в качестве маркеров генов устойчивости к вирусам. Результаты этих исследований свидетельствуют о совместных действиях геномов органелл и ядерных генов в защитных механизмах против вирусной инфекции (Палилова и др., 2002a).

Большой и оригинальный экспериментальный материал получен при использова-

нии специально созданной модельной системы родственных клонов картофеля, контрастных по устойчивости к X- и L-вирусам. Эта модельная система клонов позволила выявить полиморфизм спектров разных фракций легкорастворимых белков между контрастными по резистентности клонами с общим геномом, что, в свою очередь, позволяет идентифицировать белки, участвующие в реакциях устойчивости или восприимчивости к этим вирусам (Палилова и др., 2002б). Дальнейшее исследование этих белков методами молекулярной генетики даст возможность идентифицировать белки-маркеры генов устойчивости к данным вирусам и рекомендовать их для использования в селекционном процессе для оценки устойчивости к вирусной инфекции.

Методом полимеразной цепной реакции ДНК устойчивых и восприимчивых к вирусам клонов картофеля, имеющих общий геном, с произвольными праймерами обнаружен полиморфизм продуктов амплификации ДНК этих клонов, свидетельствующий о мутагенной природе изменения этого признака (Палилова и др., 2002в).

Изучение созданной системы клонов картофеля позволило также получить принципиально новые данные об особенностях экспрессии генов устойчивости к вирусной инфекции в ходе онтогенетического развития у эу- и аллоплазматических сортов картофеля, различающихся по типу реакции на заражение.

Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в контроле морфогенетических процессов, индуцированных в культуре клеток и тканей растений *in vitro*

На большом экспериментальном материале, включающем рецiproкные гибриды пшеницы, аллоплазматические линии с ядерными геномами мягких пшениц и цитоплазмой диких видов, рецiproкные межвидовые и межсортовые гибриды пшеницы и др., показано, что основные этапы развития в культуре тканей *in vitro* – дедифференцировка, рост клеточной массы, индукция регенерации – осуществляются при участии цитоплазматических генов (Орлов, Палилова, 1989). Впервые показано, что замещение

цитоплазмы может существенно изменять параметры, характеризующие способность растений к индукции каллусных культур, их пролиферации и регенерации целых растений при культивировании соматических и генеративных тканей (Орлов, 2001).

Выявлены цитоплазмы, положительно влияющие на индукцию каллусов и регенерацию растений. Показана зависимость влияния цитоплазмы от типа ткани экспланта. На основе методов дифференциальных индексов и кластерного анализа исследованные цитоплазмы классифицированы на пять групп, которые могут соответствовать их филогенетическому родству.

Получены новые данные об экспрессии ядерных и цитоплазматических генов, связанных со способностью растений к радикальной перестройке онтогенетических процессов при помещении их тканей *in vitro*. В частности, показано взаимодействие ядерной, хлоропластной и митохондриальной генетических систем в механизмах фитогормональной регуляции морфогенетических процессов в культуре пыльников пшеницы (Orlov, Pyko, 1999).

На основе всестороннего анализа характера морфогенеза в культуре клеток и тканей у аллоплазматических и эуплазматических линий пшеницы сформирована концепция генетики морфогенеза у растений на примере аллоплазматических линий пшеницы, включающая как неотъемлемую часть взаимодействие генома и плазмона в контроле отдельных его этапов. Роль каждого из компонентов взаимодействия неоднозначна в контроле отдельных этапов морфогенеза (Орлов, 1995).

Предполагается, что ведущую роль в формировании морфоструктур *in vivo* играют ядерные гены, которые используют цитоплазму как субстрат. Ряд этапов морфогенеза, особенно в формировании генеративных тканей, контролируются взаимодействием ядерных и цитоплазматических генов, где цитоплазма выступает как равноценный компонент взаимодействующих систем. Формирование основных свойств и признаков растений, в том числе и генеративной сферы растительной пыльцы, протекает при наиболее благоприятном сочетании генома и плазмона (у эуплазматических форм). В слу-

чае цитоплазматической мутации или замещения собственной цитоплазмы на чужеродную возникает дисбаланс между взаимодействующими компонентами геномов, что приводит к нарушению морфогенеза генеративных и соматических тканей пыльника. Основные этапы морфогенеза в культуре тканей (дифференцировка, пролиферация каллуса, индукция эмбриогенеза, регенерация) также осуществляются под совместным контролем ядерных генов и плазмогенов, о чем свидетельствует усиление или ингибирование морфогенетических процессов при замещении собственной цитоплазмы вида растений на чужеродную. В результате этих работ были созданы новые формы растений пшеницы, являющиеся источниками высокого эмбриогенного потенциала в культуре тканей. Использование таких форм растений позволит значительно повысить эффективность проведения селекции и генетической трансформации растений (введение в геном отдельных полезных генов). Наряду со значительной их важностью для фундаментальной науки они имеют также практическое значение для селекции растений на продуктивность, устойчивость к патогенам, неблагоприятным факторам среды и на проявление гетерозиса.

Селекционные формы растений, созданные в ходе выполнения исследований по циклу работ, и методы внедрены в производство и практику более чем в 15 отраслевых научно-исследовательских учреждениях и опытных станциях. Переданы в мировую коллекцию генетических ресурсов (г. Санкт-Петербург), селекционные учреждения Беларуси и стран СНГ более 200 образцов аллоплазматических, изогенных и самоопыленных линий пшеницы, кукурузы, сои, являющихся донорами хозяйственно ценных признаков.

Изучение чужеродных цитоплазматических генов-источников мужской стерильности у пшеницы позволило разработать эффективные способы их использования для производства гибридных семян этой культуры в промышленных масштабах. Получено авторское свидетельство на «Способ получения гибридных семян пшеницы».

Разработан метод оценки устойчивости картофеля к вирусам по реакции мембранных структур клетки и метод оценки вирусосо-

устойчивости картофеля «Способ оздоровления селекционных сортов картофеля от заражения X-вирусом».

На основе теоретических исследований роли плазмона в полигенной резистентности разработан новый метод селекции на болезнеустойчивость «Способ повышения частичной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине». Созданы два высокоурожайных устойчивых к болезням сорта мягкой яровой пшеницы Рассвет и Тома совместно с селекционерами Института земледелия и селекции НАН Беларуси. Сорт Рассвет обладает высокими технологическими качествами и рекомендован для возделывания на всей территории Республики Беларусь. Экологически пластичный сорт Тома проходит госсортоиспытание в Республике Беларусь.

В выполнении исследований по основным направлениям цикла работ существенную финансовую поддержку оказал Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований. За период с 1996 по 2002 гг. финансировались 7 грантов БРФФИ, 4 гранта получены на приобретение компьютеров, 2 гранта на издание монографий. Авторы цикла работ выражают глубокую благодарность Фонду фундаментальных исследований за оказанную помощь.

Литература

- Булойчик А.А., Волуевич Е.А. Модифицирующее действие чужеродных цитоплазм на устойчивость пшеницы к природной популяции мучнистой росы в онтогенезе растения-хозяина // Цитология и генетика. 1998. Т. 32, № 3. С. 51–58.
- Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Ядерно-цитоплазматические взаимодействия в устойчивости пшеницы к грибным патогенам. Сообщение 8. Специфичность внутривидовых цитоплазматических эффектов в реакциях совместимости *Triticum aestivum* с бурой ржавчиной // Генетика. 1995. Т. 31, № 3. С. 368–373.
- Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Влияние чужеродного плазмона растения-хозяина на устойчивость мягкой пшеницы к возбудителю твердой головни // Цитология и генетика. 1999. Т. 33, № 4. С. 43–48.
- Волуевич Е.А., Лупей А.Ю. Модифицирующее действие цитоплазматических генетических систем на толерантность яровой пшеницы к септориозу // Докл. НАН Беларуси. 1999.

- Т. 43, № 4. С. 79–82.
- Орлов П.А. Взаимодействие генома и плазмона в дифференцировке тканей и развитии растений (на примере пшеницы): Автореф. дис. ... д.б.н. Минск: ИГиЦ АНБ, 1995. 34 с.
- Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. Минск: Юнипак, 2001. 172 с.
- Орлов П.А., Палилова А.Н. Модифицирующее влияние чужеродных цитоплазм на индукцию и рост каллуса аллоплазматических линий пшеницы // Генетика. 1989. Т. 25, № 12. С. 2168–2175.
- Павлючук Н.В., Ахраменко А.Д., Палилова А.Н. Эффективность клонового отбора на резистентность к X-вирусу в пределах сортов популяций картофеля // Докл. НАН Беларуси. 1998. Т. 6. С. 77–80.
- Палилова А.Н. Нехромосомная наследственность. Минск: Наука и техника, 1981. 196 с.
- Палилова А.Н. Генетические системы у растений и их взаимодействие. Минск: Наука и техника, 1986. 160 с.
- Палилова А.Н., Домаш В.И., Забрейко С.А. и др. Изменение компонентного состава белков ингибиторов трипсина в клубнях картофеля, индуцируемое отбором на устойчивость к вирусам // Докл. НАН Беларуси. 2002а. Т. 46, № 5. С. 106–109.
- Палилова А.Н., Павлючук Н.В., Ахраменко А.Д. и др. Роль дикого типа в повышении устойчивости димиссоидов к фитопатогенным вирусам // Материалы VIII съезда генетиков и селекционеров Республики Беларусь. Минск, 2002б. С. 129–130.
- Палилова А.Н., Урбанович О.Ю., Долматович Т.В. и др. Дифференциация устойчивых и восприимчивых клонов картофеля к X- и L-вирусам методом полимеразной цепной реакции // Докл. НАН Беларуси. 2002в. Т. 46, № 1. С. 87–89.
- Турбин Н.В., Палилова А.Н. Генетические основы цитоплазматической мужской стерильности у растений. Минск: Наука и техника, 1975. 184 с.
- Orlov P.A., Pyko V.I. Green and albino plant regeneration in anther culture of alloplasmic wheat lines // Proc. Intern. Congr. «Anther and pollen: from biology to biotechnology». Sprigler-Verlag, 1999. P. 229–236.
- Voluevich E.A., Bulovichik A.A. Interaction of nuclear and cytoplasmic genetic systems of host-plant in common wheat resistance to leaf rust // Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines. Novosibirsk, 2001. P. 111–114.

Basic and applied problems of nuclear-cytoplasmic genetic systems interactions in plants

A.N. Palilova, P.A. Orlov, E.A. Voluevich

Institute Genetics and Cytology of NASB, 220072, Minsk, Belarus,
e-mail: A.Palilova@igc.bas-net.by

Summary

The results of the investigations carried out at the Institute of Genetics and Cytology of NASB under professor A.N. Palilova supervision on the problem of nuclear and cytoplasmic genetic system interaction in controlling plant development, formation of their resistance to unfavorable environmental factors, fungal and viral pathogens, are summarized in the paper. The most important and priority elaborations that have been taken as the basis of the work cycle awarded with a State Price of the Republic of Belarus in 2003 were distinguished.