

## АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ФЕРТИЛЬНЫХ И МУЖКОСТЕРИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS*)

А.Г. Брагин<sup>1</sup>, М.К. Иванов<sup>1,2</sup>, Л.А. Федосеева<sup>1</sup>, Г.М. Дымшиц<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: abgicg@mail.ru;

<sup>2</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Впервые для характеристики гетероплазматического состояния мтДНК растений применен метод высокочувствительного ПЦР в реальном времени с использованием гидролизуемых флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов. Путем оценки копийности универсальных и *N*- и *Svulg*-специфичных маркеров в мтДНК сахарной свеклы *N*- и *Svulg*-типов на расширенной выборке растений различных линий и сортов с использованием оптимизированной ПЦР в реальном времени впервые показано, что гетероплазмия является естественным состоянием мтДНК *Beta vulgaris* как *N*-, так и *Svulg*-типов, и что количество доминирующего и минорного вариантов может отличаться более чем на 6 порядков.

**Ключевые слова:** *Beta vulgaris*, митохондриальная ДНК, гетероплазмия, ПЦР в реальном времени.

### Введение

Митохондриальная гетероплазмия (сосуществование в ткани или клетке альтернативных вариантов последовательности мтДНК или более чем одного митохондриального гаплотипа) широко распространена среди многоклеточных эукариот – от растений до человека (Kmiec *et al.*, 2006). Варианты последовательности мтДНК могут отличаться точечными заменами (SNP) или обширными структурными изменениями, затрагивающими в том числе и кодирующие последовательности. В зависимости от дозы мутантных вариантов в общем пуле мтДНК, которая может резко меняться в поколениях, последние могут способствовать фенотипическому проявлению связанных с ними признаков (часто представляющих собой патологии).

Такая ситуация типична для многих видов высших растений, в популяциях которых наряду с нормальным типом мтДНК наблюдается существование альтернативных типов, ассоциированных с признаком цитоплазматической муж-

ской стерильности (ЦМС), который заключается в формировании пыльников с abortивной пыльцой (Schnable, Wise, 1998; Kubo, Mikami, 2007). МтДНК ЦМС-типа обычно характеризуется множественными структурными перестройками, некоторые из них изменяют кодирующие части генов либо их локализацию и приводят к образованию химерных транскрибируемых рамок считывания (Sarría *et al.*, 1998; Arrieta-Montiel *et al.*, 2001).

У сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) в формировании оуэновского типа ЦМС участвует *Svulg*-тип мтДНК. По сравнению с нормальным (*N*-) типом он характеризуется измененной структурой и экспрессией ряда генов, а также множественными различиями в некодирующих областях (Satoh *et al.*, 2004). Структурное состояние митохондриального генома сахарной свеклы мало изучено, хотя имеются данные о том, что, как и в случае ряда других видов высших растений, он состоит из набора линейных и кольцевых субгеномных молекул различного размера с возможностью рекомбинации между

ними благодаря наличию многочисленных повторов (Brears, Lonsdale, 1988). Эти молекулы могут независимо реплицироваться и содержаться в общем пуле мтДНК в неравных стехиометрических соотношениях.

Ранее нами при помощи ПЦР были проанализированы мужскостерильные и фертильные растения сахарной свеклы с разным типом цитоплазмы. Было обнаружено наличие всех исследованных маркеров мтДНК *N*-типа в мужскостерильных растениях и некоторых *Svulg*-специфичных маркеров – в фертильных (Брагин и др., 2006), что свидетельствовало в пользу гетероплазматического характера организации мтДНК сахарной свеклы. Невозможность обнаружения ряда *Svulg*-специфичных маркеров в составе мтДНК фертильных растений в работах Брагина с соавт. (2006), Cheng с соавт. (2009) может объясняться как несовершенством использованных методов, не позволяющих обнаружить единичные копии аллогенных последовательностей в чужеродном окружении, так и принципиальным отсутствием части последовательностей мтДНК *Svulg*-типа в митохондриях фертильных растений и их возникновением *de novo* в процессе конверсии к ЦМС-фенотипу. Решение этого вопроса принципиально важно для понимания организации митохондриального генома *B. vulgaris*.

В настоящей работе использован усовершенствованный метод ПЦР в реальном времени, основанный на использовании гидролизующих флюоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов и позволяющий детектировать единичные копии исследуемой последовательности в ПЦР-смеси. Это дало возможность провести анализ относительного содержания маркерных последовательностей как специфичных для *N*- и *Svulg*-типов мтДНК, так и общих для этих типов, и количественно охарактеризовать гетероплазмию мтДНК сахарной свеклы в линейных материалах, отличающихся по пыльцевому фенотипу.

## Материалы и методы

В работе анализировались растения, представленные Е.И. Малецкой, С.И. Малецким и Е.В. Левитесом (лаборатория популяционной генетики растений, ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск), линий СОАН-31, СОАН-252 (фертильные линии О-типа – закрепители стерильности), СОАН-22 (фертильные растения, высокий процент конверсии к стерильному фенотипу), мсСОАН-22, мсСОАН-31, мсСОАН-252 (стерильные аналоги перечисленных фертильных линий), а также сортов Ганусовская односемянная 55, Белоцерковская односемянная 40, Янаш А3 (фертильные растения), мсКНВС2 и мсКWS1 (стерильные растения, апозиготически поддерживающиеся на *Svulg*-цитоплазме) (Мглинец и др., 1995; Аульченко и др., 1997; Вепрев и др., 1997).

мтДНК выделялась из корней и проростков как описано в статьях (Rogstad, 2003; Брагин и др., 2006) соответственно. ПЦР проводили с использованием 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 mM Трис-НСl (рН 8,9), 1,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween-20), dNTP 200 μM, 0,2 е.а. Taq-полимеразы, моноклональные антитела к Taq-полимеразе, специфические праймеры 0,5 μM, олигонуклеотидный зонд 0,25 μM, различные количества ДНК-матрицы. Реакцию проводили на амплификаторе с оптическим модулем iCycler iQ5 («Bio-Rad Laboratories», США) в трех повторах для каждого образца, с постановкой отрицательных контролей (без добавления мтДНК). Праймеры и зонды для ПЦР подбирали при помощи программы Oligo Analyzer в соответствии с известными последовательностями для *N*- и *Svulg*-вариантов мтДНК сахарной свеклы с использованием баз данных NCBI. В работе использовались три маркера, входящие в состав мтДНК как *N*-, так и *Svulg*-типов (в скобках приведены последовательности праймеров и флюоресцентно меченного зонда):

*orf-B* (5'-TGCCTGTCCCATGCGTTGTT-3',  
5'-AGGCATGACCAGAAGAATTGTGTGA-3',  
5'-R6G-ACCACCATTT(BHQ1)CTAGAGGCTTGACGGA-3'),  
*cox II* (5'-TGGACATCAATGGTATCGG-3',  
5'-TACCAGTAAGCCAGATGCT-3',  
5'-Cy5-AGTGCGCCT(BHQ1)CTTCACGAAGGTGATTT-3') и

*rps4* (5'-CTTAGAAAGAACAAGAAGTTTGGA-3',  
5'-CGATAAGAATAAGGTCACGGAG-3',  
5'-Cy5-CGACGCT(BHQ2)GAGCACAACAGAATGAAGAGGAA-3');  
два маркера, уникальных для мтДНК *Svulg*-типа:  
*orf324* (5'-CATTTTGTTAATGATGGCTGCTTTGA-3',  
5'-CCCTTTCCCCCTTCAGAG-3',  
5'-FAM-CCTCT(BHQ1)GTCGCATCGAAGCCCAAGATCTC-3') и  
*S-RAPD* (5'-CAGAAGCTGAACCCGACACCAA-3',  
5'-GAAGAAGGGAGTGAGGCATTAACGA-3',  
5'-R6G-TGCTCAT(BHQ1)ATCCCAACTGGAGAGTCGT-3')  
и один, уникальный для мтДНК *N*-типа:  
*orf246* (5'-CTCGGGGCTCCATGTAGTATTAGG-3',  
5'-GGTGGATTATCAAGTCGAAAGGCG-3',  
5'-FAM-TGGGCTTTCCCT(BHQ1)GCCTTGCTTACATCGTGCT-3').

Выбранные маркерные участки равномерно распределены по геному и соответствуют последовательностям с разной копийностью. Все олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО «Синтол» (г. Москва).

### Результаты

Аmplификация используемых в качестве нормировочных генов маркеров *coxII* и *rps4* была оптимизирована путем подбора концентраций праймеров и катионов магния в реакционной смеси, а также использованием «горячего старта», основанного на добавлении в реакционную смесь моноклональных антител, блокирующих активность Taq полимеразы (Rybalkin *et al.*, 1996). Оценка динамического диапазона показала, что в оптимизированных условиях стандартная кривая остается линейной ( $R^2 > 0,99$ ) в пределах от 100 до  $10^8$  копий на реакцию, чувствительность детекции при этом составила 50 копий маркерной последовательности на 1 г растительной ткани, что существенно превышает чувствительность методик, ранее использовавшихся для оценки гетероплазмии мтДНК сахарной свеклы (Брагин и др., 2006; Cheng *et al.*, 2009).

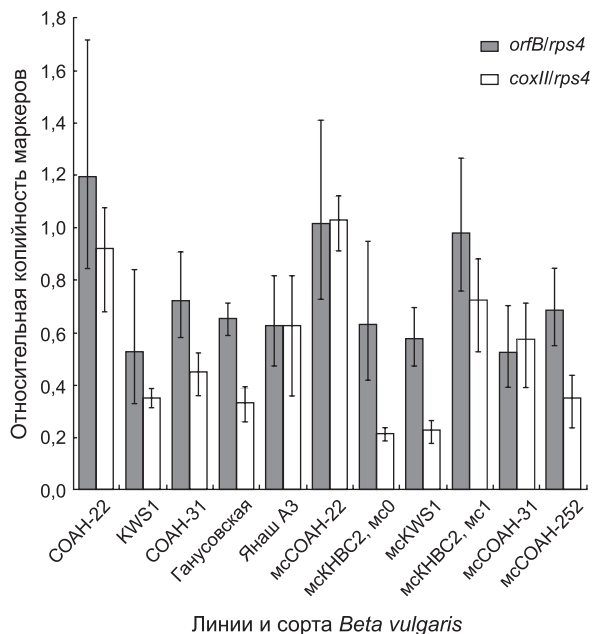
Сравнение копийности универсальных маркеров *rps4* и *coxII* с использованием выборки растений линий СОАН-22 и мсСОАН-22, включавшей по 5 растений каждой линии, показало, что соотношение *rps4/coxII* варьирует незначительно как в пределах линии, так и между линиями с вероятностью более 99 %, составляя  $1,03 \pm 0,25$  при межлинейном сравнении.

Соотношения маркеров *rps4/coxII* оказались близкими и при сравнении растений различных линий, что позволило использовать любой из них в качестве нормировочного гена.

Копийность маркеров мтДНК определялась с использованием мультиплексного количественного ПЦР в реальном времени, в реакционную смесь добавлялись праймеры и зонды, соответствующие нормировочному маркеру *rps4* (зонд был мечен флуорофором Cy5), и праймеры и зонды детектируемых последовательностей *orfB*, *orf324*, *orf246* или *S-RAPD* (зонды были мечены FAM или R6G).

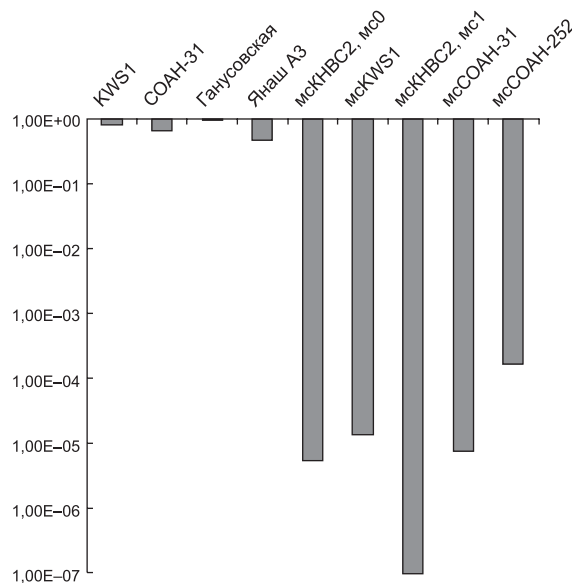
Оценка копийности универсального маркера *orfB* показала равное его присутствие как в цитоплазмах фертильных растений (соотношение от 0,52 для KWS1 до 1,20 для СОАН-22), так и в цитоплазмах растений ЦМС-линий (соотношение от 0,52 для мсСОАН-31 до 1,01 для мсСОАН-22) (рис. 1). Это вкпе с данными о повсеместном присутствии универсального маркера *coxII* свидетельствует в пользу того, что стехиометрия последовательностей в составе доминирующего генома изменяется в ограниченных пределах (не более одного порядка), и структура превалирующей формы генома стабильна даже в дифференцированных вегетативных тканях растения.

Анализ копийности *orf246* показал, что этот маркер количественно преобладает в линиях фертильных растений, обнаруживая незначительную межлинейную вариацию. Если принять количество нормированного на *rps4* маркера *orf246* в растениях сорта Ганусовская за 100 %, то количества этого маркера в мтДНК других фер-



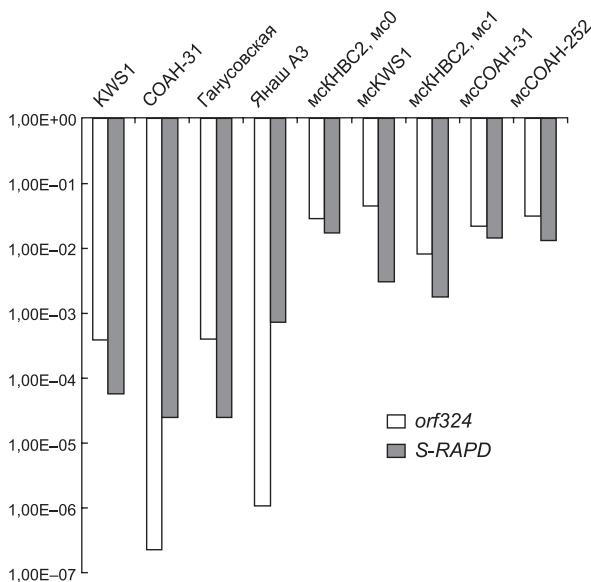
**Рис. 1.** Копийности универсальных маркеров *orfB* и *coxIII*, нормированные на копию универсального маркера *rps4*.

тильных растений составят 50, 69 и 88 % для сортов Янаш А3, СОАН-31 и KWS1 соответственно, т. е. копиинности отличались не более чем вдвое (рис. 2, табл.). Сходная картина наблюдалась и для мтДНК стерильных линий сахарной свеклы, в которых соотношение *rps4/orf246* составляло от 6000 (мсСОАН-252) до 183000 (мсКНВС2, мс0). В одном из исследованных образцов (мсКНВС2, мс1) указанная последовательность не была обнаружена, что, по всей вероятности, свидетельствует о том, что она была утрачена в мтДНК корня в ходе онтогенетического развития растения. Важно то, что использование усовершенствованного метода ПЦР в реальном времени позволило выявить *N*-специфичную последовательность во всех исследованных образцах с *Svulg*-цитоплазмой, кроме одного, что указывает на то, что мтДНК у *B. vulgaris* является гетероплазматичной. Крайне малая копиинность *N*-специфических последовательностей в *Svulg*-цитоплазме объясняется тем, что в качестве источника мтДНК использовались дифференцированные ткани растения. По-видимому, после прохождения стадий дифференцировки клетки могут терять минорный вариант мтДНК, в то время как клетки меристематических тканей сохраняют и передают «трансмиссивную форму» (Arrieta-Montiel *et al.*, 2001).



**Рис. 2.** Копийность *N*-специфичного маркера *orf246*, нормированная на копию универсального маркера *rps4*.

Оценка копиинности *Svulg*-специфичных маркеров подтвердила полученные нами ранее данные о присутствии последовательностей, специфичных для плазмотипов стерильных линий в составе мтДНК растений фертильных линий (рис. 3 и табл.). Анализ копиинности



**Рис. 3.** Копийности *Svulg*-специфичных маркеров *orf324* (белые столбики) и *S-RAPD* (серые столбики), нормированные на копию универсального маркера *rps4*.

Таблица

Соотношение копийностей маркеров в различных линиях сахарной свеклы

Линии <i>B. vulgaris</i>	Отношение копийностей <i>orf246</i> и <i>rps4</i>	Отношение копийностей <i>orf324</i> и <i>rps4</i>	Отношение копийностей <i>S-RAPD</i> и <i>rps4</i>
СОАН-22	$3,78 \times 10^4$	1,07	$1,10 \times 10^2$
KWS1	$8,35 \times 10^1$	$3,94 \times 10^4$	$5,81 \times 10^5$
СОАН-31	$6,60 \times 10^1$	$2,30 \times 10^7$	$2,46 \times 10^5$
Ганусовская	$9,53 \times 10^1$	$3,99 \times 10^4$	$2,51 \times 10^5$
Янаш А3	$4,80 \times 10^1$	$1,07 \times 10^6$	$7,20 \times 10^4$
цмсСОАН-22	$3,79 \times 10^6$	$9,81 \times 10^1$	$2,59 \times 10^2$
мсКНВС2, мс0	$5,47 \times 10^6$	$2,90 \times 10^2$	$1,72 \times 10^2$
мсKWS1	$1,38 \times 10^5$	$4,51 \times 10^2$	$3,02 \times 10^3$
мсКНВС2, мс1	$1,00 \times 10^7$	$8,09 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$
мсСОАН-31	$7,52 \times 10^6$	$2,16 \times 10^2$	$1,44 \times 10^2$
мсСОАН-252	$1,68 \times 10^4$	$3,10 \times 10^2$	$1,32 \times 10^2$

маркера *orf324* в расширенном спектре линий показал, что соотношение количества этой *Svulg*-специфичной последовательности к количеству универсального маркера *rps4* варьирует от 1 : 22 (линия мсKWS1) до 1 : 123 (образец линии мсКНВС2 с пыльцевым фенотипом мс1). Сходные данные получены и для другого ЦМС-специфичного маркера – *S-RAPD* с той оговоркой, что его количество оказалось ниже такового *orf324* для всех исследованных растений ЦМС-линий и составляло в соотношении с *rps4* от 1 : 69 (линия мсСОАН-31) до 1 : 564 (образец линии мсКНВС2 с пыльцевым фенотипом мс1). При этом между количествами обоих маркеров наблюдалось хорошее соответствие. Стоит отметить связь между пыльцевым фенотипом и копийностью *Svulg*-специфичных маркеров для двух исследованных растений линии мсКНВС2: в растении, характеризующемся пыльцевым фенотипом мс0, количество обеих маркерных последовательностей примерно на порядок превышает таковое в случае растения с мс1 фенотипом (частичная фертильность), при этом мс1 растение характеризуется минимальным количеством ЦМС-специфичных маркеров среди всех растений с оуэновским плазматипом.

Анализ количества *Svulg*-специфичных маркеров в образцах растений с *N*-цитоплазмой показал повсеместное присутствие обеих последовательностей, при этом копийность маркеров была в среднем на 3 порядка меньше, чем в образцах

с *Svulg*-цитоплазмой для *orf324* и в среднем на 2 порядка меньше для *S-RAPD*. Это согласуется с высказанным ранее предположением о присутствии *Svulg*-специфичных последовательностей в цитоплазме фертильных растений в субстехиометрических количествах (Брагин и др., 2006). Все исследованные образцы можно разделить на две группы, опираясь на копийности *Svulg*-специфичных маркеров: в первую входят растения, в которых соотношение как *orf324/rps4*, так и *S-RAPD/rps4* будет больше 1 : 1000 – все растения этой группы принадлежат к ЦМС-линиям; во второй группе окажутся растения, для которых указанные соотношения будут меньше, чем 1 : 1000 (т. е. оба указанных маркера будут представлены в субстехиометрическом состоянии) – все растения этой группы фертильны.

### Обсуждение

Переход к более совершенному варианту ПЦР в реальном времени, основанному на использовании флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов, нормировка специфических маркеров мтДНК на универсальные, оптимизация состава ПЦР-смеси и внедрение «горячего старта» в совокупности с анализом расширенной выборки растений позволили получить более полную картину организации мтДНК у *B. vulgaris*. Показано, что как *N*-, так и *Svulg*-специфичные маркеры повсеместно присутствуют



в цитоплазмах растений как с оуэновским плазмотипом, так и с плазмотипом, обеспечивающим образование фертильной пыльцы. Эти данные согласуются с фактами спонтанной конверсии к стерильности и спонтанной реверсии к фертильности (Аульченко и др., 1997; Вепрев и др., 1997), а также свидетельствуют в пользу независимого сосуществования митохондриальных геномов *N*- и *Svulg*-типов в пределах митохондрий растений одной линии, что подтверждается независимым накоплением точечных мутаций разными вариантами последовательности (Satoh *et al.*, 2004; Брагин и др., 2006).

Чрезвычайно важным является то, что стехиометрия *N* и *Svulg*-специфичных последовательностей находится в прямой зависимости от типа цитоплазмы для таких маркеров, как *N*-специфичный *orf246* и *Svulg*-специфичные *orf324* и *S-RAPD*, в то время как представленность универсальных маркеров *orfB*, *rps4* и *coxII* от типа цитоплазмы не зависит. Это подтверждает данные о преимущественном присутствии последовательностей, вошедших в состав мастер-хромосомы *N*-типа (Kubo *et al.*, 2000), в цитоплазме фертильных растений и преимущественном присутствии последовательностей, вошедших в состав мастер-хромосомы *Svulg*-типа (Satoh *et al.*, 2004), в цитоплазме растений с оуэновским типом ЦМС. Наличие связи между стехиометрией маркерных последовательностей и типом цитоплазмы позволяет использовать их для быстрого высокочувствительного типирования цитоплазмы сахарной свеклы, широко востребованного в селекционной практике (Cheng *et al.*, 2009). Полученные результаты дополняют и систематизируют информацию об организации митохондриального генома *B. vulgaris* и указывают на то, что гетероплазмия является естественным состоянием митохондриального генома растений этого вида.

### Литература

- Аульченко Ю.С., Вепрев С.Г., Аксенович Т.И. Изменение типа цитоплазмы сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге. II. Сегрегационный анализ родословной // Генетика. 1997. Т. 33. С. 808–815.
- Брагин А.Г., Иванов М.К., Дымшиц Г.М. Оценка стехиометрии маркерных последовательностей митохондриального генома сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) методом ПЦР в реальном времени // Докл. АН. 2006. Т. 406. Вып. 2. С. 260–265.
- Вепрев С.Г., Дикалова А.Э., Мглинец А.В. и др. Изменение типа цитоплазмы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге. I. Гибридологический анализ и тестирование типа митохондриальной ДНК // Генетика. 1997. Т. 33. С. 799–807.
- Мглинец А.В., Вепрев С.Г., Малецкий С.И. Принципы и методы создания цмс-аналогов инбредных линий сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Каталог коллекции // Генетические коллекции растений. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН, 1995. Вып. 3. С. 229–249.
- Arrieta-Montiel M., Lyznik A., Woloszynska M. *et al.* Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean // Genetics. 2001. V. 158. P. 851–864.
- Brears T., Lonsdale D.M. The sugarbeet mt genome: a complex organization generated by homologous recombination // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 214. P. 514–522.
- Cheng D., Kitazaki K., Xu D. *et al.* The distribution of normal and male-sterile cytoplasms in Chinese sugar-beet germplasm // Euphytica. 2009. V. 165. P. 345–351.
- Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals // Curr. Genet. 2006. V. 50. P. 149–159.
- Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A. *et al.* The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA<sup>Cys</sup>(GCA) // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 2571–2576.
- Kubo T., Mikami T. Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome // Physiol. Plant. 2007. V. 129. P. 6–13.
- Rogstad S.H. Plant DNA Extraction Using Silica // Plant Mol. Biol. Reporter. 2003. 21. 463a–463g.
- Rybakina I.N., Mukhamedova N.M., Vlasik T.N., Chenchik A.A. The new technology of hot start polymerase chain reaction // Bull. Exptl Biol. Med. 1996. V. 121(2). P. 0007–4888 (Print) 1573–8221 (Online).
- Sarria R., Lyznik A., Vallejos C.E., Mackenzie S.A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide is post-translationally regulated // Plant Cell. 1998. № 10. P. 1217–1228.
- Satoh M., Kubo T., Nishizawa S. *et al.* The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs // Mol. Gen. Genomics. 2004. V. 272. P. 247–256.
- Schnable P.S., Wise R.P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration // Trends Plant Sci. 1998. V. 3(5). P. 175–180.

## ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA HETEROPLASMY IN FERTILE AND OWEN CMS SUGAR BEET (*BETA VULGARIS*) PLANTS

A.G. Bragin<sup>1</sup>, M.K. Ivanov<sup>1,2</sup>, L.A. Fedoseeva<sup>1</sup>, G.M. Dymshits<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: abgicg@mail.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Real-time PCR with fluorescent hybridization probes was used for plant mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy state characterization for the first time. Analysis of *N*- and *Svulg*-specific sequence stoichiometry in sugar beet mtDNA indicates that heteroplasmy should be treated as native plant mtDNA behavior. Genome-specific sequence quantity determination shows that the copy number of minor genome sequences can be less than that of main genome sequences by more than six orders of magnitude.

**Key words:** *Beta vulgaris*, mitochondrial DNA, heteroplasmy, real-time PCR.