



## Heteroplazmia u roślin

Magdalena Wołoszyńska, Aneta Oziemlak, Hanna Jańska  
Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski,  
Wrocław

### Heteroplasmy in plants

#### Summary

Heteroplasmy is the state characterised by the presence of more than one type of mitochondrial or chloroplast genome in one organism. Infrequent recombinations across short repeated sequences often lead to heteroplasmy in higher plant mitochondria. Different *Phaseolus* species have been examined in order to understand the dynamics of heteroplasmy originating through recombination mediated by the 314 bp repeated sequence. Two techniques were applied to detect heteroplasmy: Southern hybridization with prolonged autoradiography and PCR amplification followed by hybridization or reamplification. In all examined genomes the four recombination forms were detected. However, these forms do not occur in the same relative amounts. Moreover, in the examined genomes different recombination forms exist at the predominant/substoichiometric level, but always only two of them are predominant. Based on these results and the previous data, we suggest that the changes in the heteroplasmic population of mitochondrial molecules in plants may offer the source of genetic variation in the course of evolution.

#### Key words:

heteroplasmy, plant mitochondria, bean.

#### Adres do korespondencji

Hanna Jańska,  
Instytut Biochemii  
i Biologii Molekularnej,  
Uniwersytet Wrocławski,  
ul. Tamka 2,  
50-137 Wrocław;  
e-mail:  
janska@bf.uni.wroc.pl

**biotechnologia**

1 (52) 42-46 2001

### 1. Wprowadzenie

Heteroplazmia to stan charakteryzujący się obecnością więcej niż jednego typu DNA mitochondrialnego lub chloroplastowego w organizmie. Zjawisko to jest obecnie intensywnie badane u ludzi, ponieważ towarzyszy wielu poważnym chorobom neurodegeneracyjnym powodowanym mutacjami w mitochondrialnym DNA (mtDNA) (1). Stwierdzono, że wystąpienie symptomów schorzenia jest zależne od poziomu ilościowego zmutowanego DNA

w stosunku do normalnego. Natomiast występowanie heteroplazmii u zdrowych osób jest ciągle kwestią sporną. Niektórzy uważają, że zdrowi ludzie posiadają tylko jeden typ mtDNA, natomiast inni, iż rzadka identyfikacja heteroplazmii u zdrowych ludzi jest wynikiem zbyt małej czułości wykorzystywanych metod. Stosowane do niedawna, często ręczne sekwencjonowanie DNA, nie pozwala na wykrycie obu typów mtDNA, jeśli udział jednego z nich nie przekracza 20% (2). Znacznie mniej wiadomo o heteroplazmii – jej genezie, zmienności i konsekwencjach – u roślin.

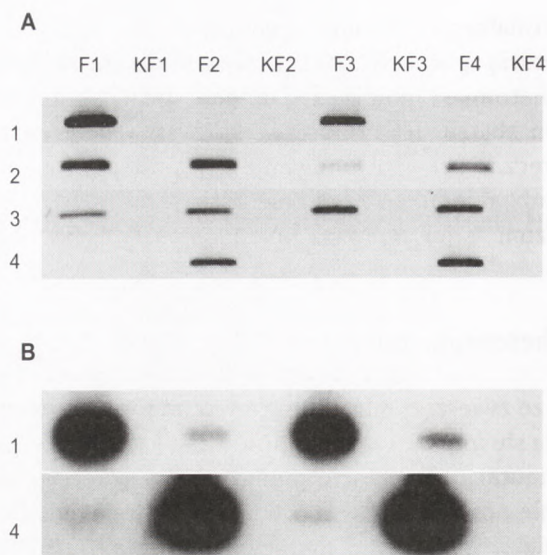
## 2. Powstawanie heteroplazmii

W porównaniu ze zwierzęcymi genomy mitochondrialne roślin są znacznie większe i charakteryzują się innym tempem mutacji punktowych (3-5). U ludzi większość identyfikowanych mutacji to mutacje punktowe i najczęściej to one są odpowiedzialne za tworzenie nowych typów mtDNA, a w konsekwencji za powstawanie heteroplazmii. Szacuje się, że tempo mutacji punktowych u roślin jest 40-100 razy wolniejsze niż u zwierząt (4). Natomiast zmienność organizacyjna spowodowana częstymi mutacjami rearanżacyjnymi jest tak duża u roślin, że nie znaleziono dwóch gatunków, u których kolejność genów byłaby taka sama (4). Z badań wynika, że za tworzenie nowych cząsteczek mtDNA u roślin są najczęściej odpowiedzialne rzadkie i nieodwracalne rekombinacje krótkich jednostek powtórzonych (do 1000 pz) (6). Prowadzą one do powstania nowego typu mtDNA w ilościach substechiometrycznych w stosunku do genomu dominującego. Takie cząsteczki noszą nazwę sublimonów. Mogą one być utrzymywane przez wiele pokoleń na niskim poziomie ilościowym. Zgodnie z podaną wcześniej definicją heteroplazmii, genomy mitochondrialne roślin, w których identyfikuje się obok genomu dominującego cząsteczki mtDNA w śladowych ilościach (formy substechiometryczne lub sublimony) są w istocie genomami heteroplazmatycznymi.

## 3. Identyfikacja heteroplazmii

Do wykazania obecności sublimonów stosuje się dwie techniki: hybrydyzację z przedłużoną ekspozycją autoradiogramów (około tygodnia) oraz łańcuchową reakcją polimerazy połączoną z hybrydyzacją lub reamplifikacją. Za pomocą PCR ilościowego określono, że liczba cząsteczek form dominujących może być stukrotnie (7), a nawet tysiąckrotnie wyższa od liczby cząsteczek form substechiometrycznych (5).

Badając genezę krótkiej jednostki powtórzonej o długości 314 pz, przypuszczalnie rekombinacyjnie aktywnej, w genomach mitochondrialnych roślin z rodzaju *Phaseolus* (2 linie z gatunku *P. vulgaris*, po jednej z gatunku *P. polyanthus*, *P. coccineus*) stwierdziliśmy, że wszystkie te genomy są heteroplazmatyczne. Za pomocą odpowiednich kombinacji starterów amplifikowaliśmy jednostkę powtórzoną zlokaliz-



Rys. 1. Detekcja czterech form rekombinacyjnych (F1, F2, F3, F4) w genomach *P. vulgaris* linii CMS-Sprite (1), linii POP (2), *P. polyanthus* (3), *P. coccineus* (4).

A: Obraz elektroforez w żelu agarozowym z bromkiem etydyny produktów amplifikacji krótkiej jednostki powtórzonej w czterech otoczeniach genomowych. Startery zaprojektowano w ten sposób, aby otrzymane produkty miały tę samą wielkość. Na każdą ścieżkę nanoszono 1/10 objętości mieszaniny po reakcji PCR.

B: Autoradiogramy otrzymane po hybrydyzacji radioaktywnie znakowanej jednostki powtórzonej do blotu zawierającego produkty amplifikacji form rekombinacyjnych u CMS-Sprite (1) i *P. coccineus* (4). W przypadku form dominujących nanoszono 1/50 mieszaniny reakcyjnej, natomiast w przypadku form substechiometrycznych – całość mieszaniny reakcyjnej.

zowaną w obrębie czterech możliwych form rekombinacyjnych (F1, F2, F3, F4). W przeprowadzonych reakcjach PCR nie zastosowano warunków, które pozwoliłyby traktować je jako PCR ilościowy, ale ilość otrzymanych produktów w przybliżeniu odpowiada poziomowi stechiometrycznemu, na jakim występuje dana forma rekombinacyjna. We wszystkich badanych genomach wykryliśmy cztery formy rekombinacyjne, ale tylko dwie amplifikowały się z większą intensywnością (rys. 1). W zależności od gatunku i linii z większą intensywnością powielane były inne formy. Tak, dla linii CMS-Sprite *P. vulgaris* dominujące są formy F1 i F3, a dla gatunku *P. coccineus* formy F2 i F4. Dla linii POP *P. vulgaris* i gatunku *P. polyanthus* wszystkie formy były widoczne w żelu po amplifikacji, ale zawsze dwie były mocniej amplifikowane: u linii POP formy F1 i F2; u gatunku *P. polyanthus* formy F3 i F4. Produkty amplifikacji form F2 i F4 u linii CMS-Sprite *P. vulgaris* oraz form F1 i F3 u *P. coccineus* nie były widoczne po elektroforezie w żelu agarozowym (rys. 1A). Obecność tych form wykryliśmy hybrydując znakowaną radioaktywnie jednostkę powtórzoną do blotu zawierającego produkty PCR (rys. 1B). Otrzymane wyniki potwierdziliśmy za pomocą hybrydyzacji

typu Southern. Hybrydując trawione restryktazami preparaty mitochondrialnego DNA badanych gatunków fasoli ze znakowaną jednostką powtórzoną i eksponując autoradiogramy w warunkach standardowych (całonocna ekspozycja) obserwowaliśmy jedynie formy dominujące. W przedłużonej ekspozycji ujawniono również słabsze pasma odpowiadające niektórym formom substechiometrycznym.

#### 4. Zmiany stechiometryczne w genomach heteroplazmatycznych jako źródło zmienności roślinnych genomów mitochondrialnych

Pod koniec lat osiemdziesiątych zaczęto sugerować, że zmiany stechiometryczne w heteroplazmii mogą być odpowiedzialne za pojawianie się nowych genomów mitochondrialnych (8). Prace te dotyczyły najczęściej zmian obserwowanych w kulturach tkankowych i dotyczyły fragmentów mtDNA. Ostatnio opublikowane przez nas wyniki badań są pierwszym doniesieniem o zmianach stechiometrycznych w heteroplazmii odpowiedzialnych za pojawienie się *in vivo* dwóch nowych genomów mitochondrialnych u fasoli zwykłej: genomu warunkującego cytoplazmatyczną męską sterylność i genomu jej płodnego rewertanta (9). Wykazaliśmy, że pojawienie się genomu warunkującego istotną w hodowli roślin cechę cytoplazmatycznej męskiej sterylności było związane z selektywną amplifikacją sublimonów obecnych w mitochondriach bezpośredniego płodnego przodka linii męskosterylnej. Jednocześnie liczba kopii genomu linii płodnej uległa redukcji do poziomu substechiometrycznego. Co więcej, okazało się, że przywrócenie płodności – tak jak pojawienie się męskiej sterylności – miało również charakter zmian ilościowych w heteroplazmatycznej populacji cząsteczek mt DNA. Opisane zmiany następowały w bardzo krótkim czasie, w obrębie bardzo blisko spokrewnionych roślin i dotyczyły ujawnienia bądź utraty specyficznego fenotypu. Z rezultatów przedstawionych na rysunku 1 wynika, że zmiany ilościowe w heteroplazmatycznej populacji cząsteczek mtDNA roślin są zjawiskiem uniwersalnym i są odpowiedzialne za ujawnianie zmienności tych genomów. Zmiany te są odwracalne, co ilustruje przykład formy rekombinacyjnej F3 (rys. 1A). Badane gatunki fasoli tworzą wspólny kompleks filogenetyczny, ale *P. polyanthus* jest bliżej spokrewniony z *P. vulgaris* niż *P. coccineus* (10). Natomiast linia POP *P. vulgaris* jest płodnym przodkiem męskosterylnej linii CMS-Sprite (9). Forma F3, obecna w ilościach substechiometrycznych u gatunku *P. coccineus*, jest natomiast dominująca u *P. polyanthus*, po czym powraca na poziom substechiometryczny u linii POP *P. vulgaris*, aby następnie stać się dominującą u linii męskosterylnej CMS-Sprite.

#### 5. Podsumowanie

Dziedziczenie mateczne mtDNA wyklucza zmienność wynikającą z rekombinacji DNA pochodzącego od obojga rodziców. W tej sytuacji w genomach mitochondrial-

nych muszą istnieć inne źródła zmienności. W przypadku roślin głównym mechanizmem generującym zmienność są rekombinacje. Natomiast za ujawnienie się tej zmienności odpowiadają zmiany ilościowe w genomach heteroplazmatycznych. Z przedstawionych badań wynika, że komórki roślinne dysponują alternatywnymi wobec genomu dominującego typami mtDNA. Heteroplazmia stanowiłaby zatem źródło zmienności genomu mitochondrialnego i zapewniałaby elastyczność w reagowaniu na zmiany w genomie jądrowym oraz prawdopodobnie na stres wynikający ze zmian w środowisku.

Praca finansowana z projektu KBN 6 P04C 01015.

### Literatura:

1. Zeviani M., Antozzi C., (1997), *Molecular Human Reproduction*, 3, 133-148.
2. Bendall K. E., Macaulay V. A., Backer J. R., Sykes C., (1997), *Am. J. Hu. Genet.*, 59, 1276-1287.
3. Jańska H., Wołoszyńska M., (1997), *Acta Bioch. Pol.*, 44, 239-250.
4. Palmer J. D., Herbon L. A., (1988), *J. Mol. Evol.*, 29, 87-97.
5. Mackenzie S., McIntosh L., (1999), *Plant Cell*, 11, 571-586.
6. Andre C., Levy A., Walbot V., (1992), *Trends Genet.*, 8, 128-132.
7. Laser B., Mohr S., Odenbach W., Oetter G., Kuck U., (1997), *Curr. Genet.*, 32, 337-347.
8. Small I. D., Suffolk R., Leaver C. J., (1989), *Cell*, 58, 67-76.
9. Jańska H., Sarria R., Wołoszyńska M., Arrieta-Montiel M., Mackenzie, S. A., (1998), *Plant Cell*, 10, 1163-1180.
10. Schmit V., du Jardin P., Baudoin J. P., Debouck D. G., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 506-516.