

В ходе исследования был изучен процесс получения микроклубней картофеля *in vitro* на классической питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением различных индукторов клубнеобразования.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0033.

Список литературы

- 1 Токбергенова Ж.А. Индуктор ускоренного получения микроклубней картофеля *in vitro* // Картофель и овощи. 2010. № 3. С. 23–24.
- 2 Тустубаева Ш. Т., Кузьмина Г. Н., Акзамбек А. М. Применение технологии получения микроклубней картофеля *in vitro* для оригинального семеноводства // Актуальные научные исследования в современном мире. 2018. № 1-8 (33). С. 33–39.
- 3 Семчук Н.Н., Шишов А.Д., Сердюк А.С., Симаков Е.А., Митюшкин А.В., Овэс Е.В. Модульная технология ускоренного размножения новых перспективных сортов картофеля // Вестник НовГУ. 2012. № 67.
- 4 Овэс Е.В., Колесова О.С., Жевора С.В. Инновационный способ выращивания микроклубней картофеля *in vitro* // Картофелеводство: сб. научн. тр. Минск. 2016. С. 353–361.
- 5 Кокшарова М.К. Микроклубни как посадочный материал // Картофель и овощи. 2016. № 3. С. 31–32.

DOI 10.18699/GPB2024-41

Перспективы использования свойств митогеномов в биотехнологии и селекции сельскохозяйственных растений

*Константинов Ю.М. *, д.б.н., зав. лабораторией.*

*ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, Россия*

**email: yukon@sifibr.irk.ru*

*Рассматриваются вопросы использования свойств митогеномов растений в решении задач биотехнологии по разработке экспрессионных систем для получения рекомбинантных белков на основе митохондрий. Во всех отношениях наиболее перспективными кандидатами на роль генетических векторов интегративного и репликативного типа для *Zea mays* являются линейные и кольцевые плазмиды (S1, S2, S3) этих органелл. Концевые инвертированные повторы (КИП) на концах линейных плазмид способствуют их более активному транспорту в митохондрии по сравнению с фрагментами ДНК той же длины, но без КИП. В свою очередь, регистрация активности митохондриальных систем синтеза РНК и ДНК *in organello* может быть использована в лабораторных условиях для отбора селекционных образцов по признаку урожайности в селекции сельскохозяйственных растений.*

Ключевые слова: кукуруза, митохондрии, линейные и кольцевые плазмиды Zea mays, импорт ДНК в митохондрии, интеграция плазмиды в митогеном, вставки митохондриальных плазмид в митогеном, система синтеза нуклеиновых кислот in organello.

Prospects for using the properties of mitogenomes in biotechnology and selection of agricultural plant species

*Konstantinov Y.M. *,*

Siberian institute of plant physiology and biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

**email: yukon@sifibr.irk.ru*

The issues of using the properties of plant mitogenomes in solving biotechnology problems in developing expression systems for producing recombinant proteins based on mitochondria are considered. In all respects, the most promising candidates for the role of genetic vectors of integrative and replicative type for Zea mays are linear and circular plasmids (S1, S2, S3) of these organelles. Terminal inverted repeats (TIRs) at the ends of linear plasmids contribute to their more active transport into mitochondria compared to DNA fragments of the same length, but without TIRs. In turn, the determination of RNA- and DNA- synthesizing activity in organello can be used in laboratory conditions for the selection of breeding samples based on yield in the breeding of agricultural plants.

Key words: corn, mitochondria, linear and circular plasmids of Zea mays, DNA import into mitochondria, integration of plasmids into the mitogenome, system of nucleic acids synthesis in organello.

Митохондрии играют ключевую роль в прохождении всех этапов онтогенеза растительного организма, начиная с эмбрионального. Нормальное функционирование этих органелл обеспечивается согласованной экспрессией митохондриального и ядерного геномов, последний при этом кодирует подавляющее число митохондриальных белков и регуляторных факторов митохондрий. Фундаментальной особенностью митохондрий является их способность после изолирования из тканей и органов сохранять *in organello* определенное время функцию дыхания и окислительного фосфорилирования, а также способность к синтезу ДНК, РНК и белка. Структура и функции митохондриального генома многих видов высших (в том, числе таких важных сельскохозяйственных растений как кукуруза, соя, картофель и др.) к настоящему времени изучены достаточно подробно [1], что создает возможность разностороннего использования свойств растительных митогеномов для решения актуальных вопросов биотехнологии и селекции. Митогеномы покрытосеменных растений отличаются от таковых животных и дрожжей помимо поразительно больших размеров (200–2400 т.п.н.) и

высокой рекомбинационной активности наличием видоспецифических наборов кольцевых и линейных плазмид, которые способны поддерживаться как в автономном, так и интегрированном в митохондриальную хромосому состоянии (см. таблицу).

Митохондриальные плазмиды растений (на основе данных [2])

Вид	Размер, т.п.н.	Структура	Интеграция в митогеном
<i>Beta vulgaris</i> <i>var. maritima</i>	1,3;1,4;1,44;1,6 1,4	кольцевая линейная	н.и.* +
<i>Chenopodium album</i>	1,3	кольцевая	н.и.
<i>Brassica campestris</i>	11,3	линейная	+
<i>Brassica napus</i> , <i>Brassica rapa</i>	11,6	линейная	-
<i>Daucus carota</i>	9,2	линейная	+
<i>Gossypium</i>	2,4; 6,5	кольцевая	н.и.
<i>Heliantus annuus</i>	1,4; 1,8	кольцевая	-
<i>Lupinus albus</i>	1,4;1,2	кольцевая	-
<i>Oenothera berteriana</i>	6,3-13,5	кольцевая	н.и.
<i>Oryza sativa</i>	0.97; 1.5; 1.55; 2.14	кольцевая	-
<i>Phoenix dactylifera</i> L.	1.16; 1.35	кольцевая	н.и.
<i>Sorghum bicolor</i>	1.36; 1.7; 2.3 5.3; 5.7	кольцевая линейная	- -
<i>Triticum aestivum</i>	0.3–6.0	кольцевая	н.и.
<i>Triticum compactum</i>	0.3–6.0	кольцевая	н.и.
<i>Vicia faba</i>	1.48; 1.7; 1.7	кольцевая	н.и.
<i>Zea mays</i> S-тип ЦМС	6.4; 5.45	линейная	+
RU-тип цитоплазмы	7.46; 5.45	линейная	+
N-тип цитоплазмы	2.1; 2.3	линейная	-
N-тип цитоплазмы	1.4; 1.9	кольцевая	н.и.
<i>Zea diploperennis</i>	5.4; 7.4	линейная	н.и.
<i>Zea luxurians</i>	0.75; 5.4	линейная	н.и.

н.и.* – не исследовано.

Наличие у линейных митохондриальных плазмид свойств автономного репликона, а также их способность к активному транспорту (импорту) в митохондрии благодаря наличию в своем составе концевых инвертированных повторов в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [3, 4] позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств доставки генетического материала в эти органеллы при решении широкого круга задач биотехнологии, наиболее важными из которых является конструирование митохондриальных генетических векторов и разработка системы генетической трансформации митохондрий. В пользу достижимости этих целей свидетельствуют результаты работы [5], в которой продемонстрирована в системе *in organello* не только доставка генетических конструкций в митохондрии, но и успешная интеграция последовательности репортерного гена

gfp в митогеном трех видов высших растений (*Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*) по принципу гомологичной рекомбинации. Условием встройки в главный митохондриальный геном фрагмента экзогенной ДНК было наличие у последнего фланков длиной ~ 500 п.н., гомологичных резидентному митогеному [5]. В развитие этого направления недавно в системе *in organello* проведено изучение эффективности регуляторных последовательностей митохондриальных генов, фланкирующих ДНК экзогенного происхождения [6]. Обнаружено, что уровень транскрипции GFP под контролем промоторов митохондриальных генов RRN26 или COXI *in organello* коррелирует с уровнем транскрипции этих генов, наблюдаемым *in vivo*. Таким образом, описанная в работе [6] система импорта и транскрипции рекомбинантной ДНК *in organello* зарекомендовала себя в качестве полезного биотехнологического инструмента для тестирования элементов генетических конструкций для последующего их применения в экспрессионной системе на основе митохондрий *in vivo*. Несмотря на связанные с ней большие ожидания и непрекращающиеся попытки создания [7], разработка надежной системы генетической трансформации митохондрий высших растений *in vivo* затруднена из-за отсутствия метода селекции трансхондриомных клеток. Использование для этих целей антибиотиков, как это имеет место в случае селекции транспластомных растений [8], полностью исключено, поскольку антибиотики являются сильнейшими ингибиторами дыхательной цепи митохондрий.

Одним из относительно малоиспользуемых в современных исследованиях свойств митогеномов является способность изолированных митохондрий при создании необходимых условий осуществлять биосинтез РНК, ДНК и белка *in organello*. Определение кинетики синтеза вышеназванных биополимеров проводили с использованием препаратов свежеизолированных митохондрий в пределах 20-минутного интервала времени [9]. С учетом важности генетических признаков, в кодировании которых принимают участие митогеномы, оправданы попытки исследований вопроса о взаимосвязи между генетическими характеристиками изолированных митохондрий и продуктивностью растений. На основании изучения кинетических параметров синтеза мтРНК в изолированных митохондриях 74 линий и гибридов кукурузы нами установлено существование достоверной зависимости между уровнем транскрипционной активности мтДНК определенного генотипа и величиной урожайности этого генотипа. Оказалось, что скорость синтеза РНК митохондриями связана отрицательной корреляционной зависимостью с урожайностью зерна (коэффициент корреляции равен $-0,96$ – $-0,99$ ($P < 0,01$)). Наличие такой связи подтверждено не только для линий и гибридов *Zea mays*, но и сортов картофеля и гороха. На основе этих результатов нами был разработан новый молекулярно-биологический способ оценки урожай-

ности у зерновых и других сельскохозяйственных культур [10, 11]. Способ позволяет осуществлять в лабораторных условиях две важных для селекционного процесса процедуры: (1) оценку потенциальной продуктивности селекционного образца относительно генотипа-стандарта; (2) количественное определение потенциальной продуктивности образца с использованием экспериментальной кривой, характеризующей зависимость между активностью синтеза мтРНК в митохондриях 4–5 генотипов-стандартов и величиной урожайности этих генотипов. Отобранные с использованием такого способа новые растительные генотипы с увеличенной относительно стандарта урожайностью зерна могут быть далее включены в систему генетико-селекционных испытаний по классической схеме, что в конечном итоге позволит значительно сократить сроки создания новых высокопродуктивных форм зерновых и зернобобовых культур.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках проекта под № гос. регистрации № 122041100052-0.

Список литературы

- 1 Gualberto J.M., Newton K.J. Plant mitochondrial genomes: dynamics and mechanisms of mutation // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. V.68. P. 225–252.
- 2 Koulintchenko M.V., Dietrich A., Konstantinov Y.M. Mitochondrial genetic transformation via biotechnological approaches or natural competence mechanism: do we have a choice? // *Biopolymers and Cell.* 2012. V. 28, № 4. С. 261–266.
- 3 Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *The EMBO Journal.* 2003. V.22, N.6. P.1245–1254.
- 4 Тарасенко Т.А., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Клименко Е.С., Константинов Ю.М. Импорт ДНК в митохондрии растений: комплексный подход для изучения *in organello* и *in vivo* // *Биохимия.* 2019. Т.84. С.1036–1048.
- 5 Milesheva D., Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration // *Nucleic Acids Res.* 2011. V.39(17):e115.
- 6 Тарасенко В.И., Тарасенко Т.А., Горбенко И.В., Константинов Ю.М., Кулинченко М.В. Дифференциальная экспрессия чужеродного гена в митохондриях арабидопсиса в системе *in organello* // *Молекулярная биология.* 2023. Т. 57, № 3. С. 460–470
- 7 Rozov S.M., Zagorskaya A.A., Konstantinov Y.M., Deineko E.V. Three parts of the plant genome: on the way to success in the production of recombinant proteins // *Plants.* 2023. V.12, № 38.
- 8 Щелкунов С.Н., Константинов Ю.М., Дейнеко Е.В. Транспластомные растения // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2011. Т.15. С.808–817.
- 9 Константинов Ю.М., Машенков А.С., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А. Реципрокная зависимость между активностями синтеза РНК и ДНК в митохондриях разных генотипов кукурузы // *Доклады РАН.* 1993. Т. 328. № 6. С. 747–749.
- 10 Константинов Ю.М., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А. Способ определения потенциальной урожайности линий кукурузы // *Авторское свидетельство № 1677888.*
- 11 Константинов Ю.М., Луценко Г.Н., Подсосонный В.А. Способ оценки урожайности у зерновых и зернобобовых культур // *Авторское свидетельство № 1543576.*