

ANNA MAJEWSKA-SAWKA i ZBIGNIEW SADOCH

Zakład Genetyki i Hodowli Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz

E-mail: a.majewska@ihar.bydgoszcz.pl

z.sadoch@ihar.bydgoszcz.pl

CYTOPLAZMATYCZNA MĘSKA STERYLNOŚĆ ROŚLIN – MECHANIZMY BIOLOGICZNE I MOLEKULARNE

WYKORZYSTANIE ROŚLIN CMS W HODOWLI

Postęp we współczesnej produkcji roślinnej związany jest z wykorzystaniem odmian heterozyjnych (mieszańcowych), które lepiej plonują niż linie rodzicielskie, są odporniejsze na choroby i niekorzystne oddziaływanie środowiska, i często charakteryzują się wzmożoną syntezą pożądaných składników, np. sacharozy czy skrobi. Linie z cytoplazmatyczną męską sterility (CMS) różnych gatunków roślin są ważnymi komponentami odmian heterozyjnych, a ich wprowadzenie do prac hodowlanych było istotnym przełomem w rolnictwie.

Niezdolność do wytwarzania funkcjonalnego pyłku eliminuje bowiem konieczność przeprowadzania pracochłonnej, ręcznej kastracji pylników, oraz gwarantuje, że otrzymane nasiona są wynikiem przekrzyżowania, a nie samozapylenia. Linie CMS są obecnie znane dla około 150 gatunków roślin (KAUL 1988), stanowią cenny materiał użytkowy, jak również materiał do badań cytologicznych, fizjologicznych i molekularnych zmierzających do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za ekspresję cechy niepłodności pyłku.

POWSTAWANIE GAMET MĘSKICH ROŚLIN PŁODNYCH

Gamety męskie roślin wytwarzane są w następstwie procesów mikrosporogenezy i gametogenezy, przebiegających w wyspecjalizowanych organach kwiatowych – pylnikach. We wczesnym etapie rozwoju pylnika dochodzi do wyróżnicowania grup komórek arche-sporialnych, które po jednym lub kilku sukcesywnych podziałach mitotycznych zaczynają dzielić się na drodze mejozy. W tej fazie są już określane jako komórki macierzyste pyłku (KMP), które w następstwie dalszego, skomplikowanego rozwoju utworzą funkcjonalne ziarna pyłkowe. Warstwa komórek bezpośrednio otaczająca różnicujące się KMP – tapetum – pełni funkcje odżywcze, jest również miejscem

wytwarzania licznych materiałów budulcowych” wykorzystywanych przez KMP podczas wzrostu.

Podział mejotyczny prowadzi do redukcji o połowę pierwotnej liczby chromosomów charakteryzującej komórki somatyczne (sporofitowe) i do powstania tetrad haploidalnych mikrospor, które u większości gatunków roślin otoczone są specjalną ścianą kalozową zbudowaną z polimerów β -(1 $\rightarrow$ 3)-glukozy. Rozpuszczenie ściany zachodzi w ściśle zaprogramowanym momencie rozwojowym, w następstwie działania β -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanazy produkowanej przez tapetum. Od tego momentu rozpoczyna się bardzo intensywny wzrost mikrospor, ich

wakuolizacja i synteza skomplikowanej ściany komórkowej. Dojrzałe mikrospory dzielą się mitotycznie, rozpoczynając tym samym dalszy etap rozwoju już jako ziarna pyłku złożone z dwóch komórek – większej wegetatywnej i znacznie mniejszej, przyściennie położonej generatywnej. U niektórych gatunków, jeszcze przed uwolnieniem pyłków z pylnika, komór-

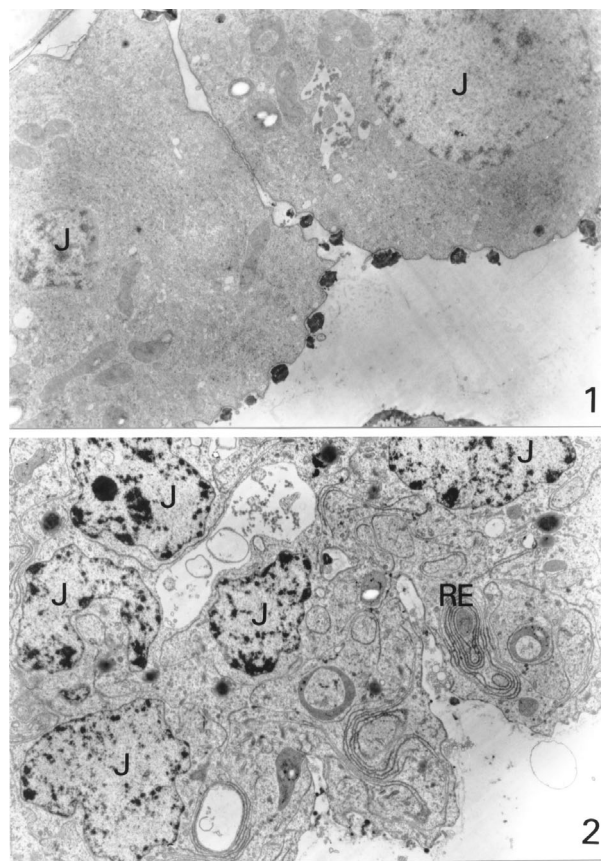
ka generatywna dzieli się mitotycznie tworząc dwie gamety męskie, natomiast w innych przypadkach podział ten zachodzi dopiero podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej na znamieniu słupka.

CYTOLOGICZNE SYMPTOMY CMS

Cytoplazmatyczna męska sterylność obejmuje szereg procesów prowadzących do zaburzeń mikrosporogenezy, których następstwem jest tworzenie нефunkcjonalnych mikrospor lub ziaren pyłkowych. Nieprawidłowości ujawniają się na różnych etapach różnicowania, najwcześniej podczas podziału mejotycznego komórki macierzystej pyłku lub tuż po zakończeniu mejozy (BINO 1985), w stadium tetrad (HORNER i ROGERS 1974), albo też w różnych fazach rozwoju haploidalnych mikrospor (MAJEWSKA-SAWKA i współaut. 1993).

Obserwacje cytologiczne pylników różnych roślin CMS wskazują, że zaburzenia cytologiczne ujawniają się przede wszystkim w dwóch tkankach, tzn. w tapetum i KMP (Ryc. 1, 2). Symptomy nienormalnego rozwoju tapetum to najczęściej nadmierna wakuolizacja, utrata charakteru komórkowego tkanki i tworzenie wielojądrowych syncytiów, jak również zaburzenia czasu naturalnej degeneracji polegające bądź to na opóźnionym, bądź też na przedwczesnym obumieraniu (LASER i LERSTEN 1972, OVERMAN i WARMKE 1972, SCOLES i EVANS 1979). Badania na poziomie subkomórkowym przy wykorzystaniu technik mikroskopii elektronowej wskazały na nieprawidłowości struktury niektórych organelli komórkowych w tapetum i KMP, głównie mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego. Mitochondria obecne w tkankach roślin płodnych charakteryzują się doskonale rozbudowanym systemem grzebieni wewnętrznych (cristae), a tym samym ogromną powierzchnią membran, w których zlokalizowane są enzymy cyklu oddechowego (Ryc. 3). W tapetum i mikrosporach roślin CMS mitochondria często są mniejsze, a system grzebieni znacznie bardziej ubogi, z nienaturalnymi rozdęciami membran (Ryc. 4) (LEE i WARMKE 1979, BINO 1985, MAJEWSKA-SAWKA i współaut. 1993). W świetle równocześnie prowadzonych badań aktywno-

ści enzymatycznej mitochondriów oraz analiz struktury mitochondrialnego DNA, właśnie te organelle, będące “roślinnymi centrami energetycznymi”, zostały wytypowane jako odpowiedzialne za zmiany fenotypowe obserwowane w pylnikach roślin CMS.

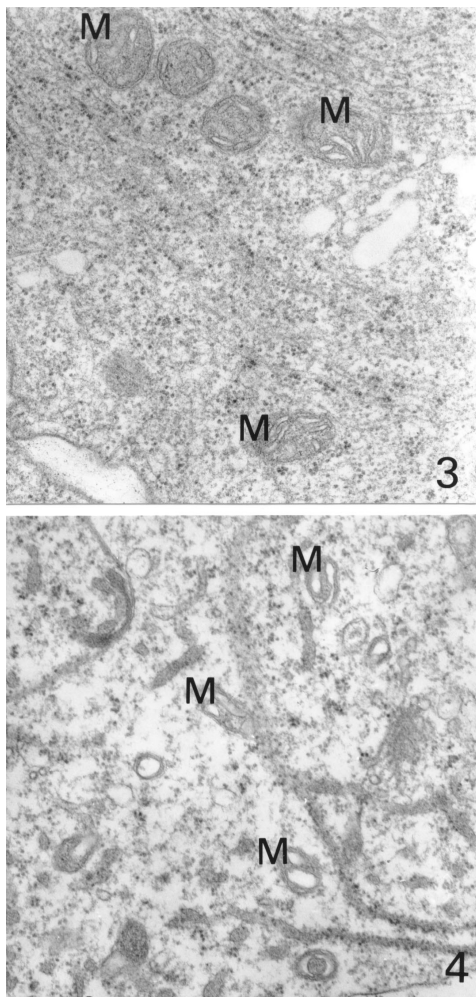


Ryc. 1–2. Struktura tapetum w pylnikach płodnych (1) i sterylnych (2) buraka cukrowego.

Symptomatyczne dla CMS jest zlewanie komórek w syncytia zawierające liczne jądra (J) i koncentryczne formy retikulum endoplazmatycznego (RE). (Fot. A. Majewska-Sawka, Ryc. 2 reprodukowana z MAJEWSKA-SAWKA i współaut. 1990, za zgodą wydawcy. 1 – 6000x, 2 – 5000x).

GENOM MITOCHONDRIALNY ROŚLIN (mtDNA)

Mitochondrialny DNA roślin odznacza się wysokim stopniem skomplikowania, zarówno pod względem struktury, jak też mechanizmów związanych z przetwarzaniem informacji gene-



Ryc. 3–4. Szczegóły struktury mitochondriów (M) obecnych w tapetum pylników płodnych (3) i męskosterylnych (4). 3, 4 – 33000x. (Fot. A. Majewska-Sawka).

tycznej. Wielkość mtDNA roślin waha się od 200 do 2400 kpz, jest to więc genom znacznie większy niż dotąd poznane mtDNA ludzi i zwierząt, których rozmiary wynoszą od 10 do 16 kpz (BACKERT i współaut. 1997).

Rozpatruje się cztery modele struktury mtDNA roślin (PRING i LONSDALE 1985):

(1) genom mitochondrialny składa się z wielu kolistych cząsteczek różnej wielkości. Każda z nich zawiera pełną informację genetyczną, ale inaczej zorganizowaną;

(2) każda z kolistych cząsteczek zawiera tylko część informacji genetycznej, dzięki czemu

upodabniają się one do chromosomów genu jądrowego;

(3) genom mitochondrialny może występować zarówno w postaci jednej dużej kolistej cząsteczki (pojedynczego chromosomu), jak i wielu mniejszych kolistych cząsteczek zawierających – przynajmniej w części – takie same sekwencje;

(4) mtDNA ma postać jednej dużej, kolistej cząsteczki, tzw. chromosomu głównego (ang. master chromosome).

W mitochondriach niektórych gatunków roślin (kukurydza, sorgo, burak cukrowy, słonecznik, różne gatunki roślin kapustnych) stwierdzono także obecność niezależnie replikujących się, niewielkich liniowych i kolistych cząsteczek DNA oraz dwuniciowych cząsteczek RNA (BROWN i ZHANG 1995). Tylko nieduża część genomu mitochondrialnego zawiera sekwencje kodujące białka (Tabela 1), w tym nośniki oksydoredukcyjne łańcucha oddechowego wraz ze współpracującymi z nimi enzymami z klasy oksydoreduktaz, np. dehydrogenazami, reduktazami, oksydazami (SCHUSTER i BRENNICKE 1994, KUBO i współaut. 2000). Obecność niektórych genów, np. dla podjednostki α ATPazy lub kilku podjednostek kompleksu I, jest uzależniona od gatunku.

MtDNA zawiera pewną liczbę sekwencji, tzw. otwartych ramek odczytu (ang. open reading frames, orf), mogących potencjalnie kodować geny, których funkcja pozostaje, jak dotąd, nieznana. Analizy całkowitej sekwencji genomu mitochondrialnego *Arabidopsis* i buraka cukrowego ujawniły odpowiednio obecność 85. i 559. sekwencji orf (UNSELD i współaut. 1997, KUBO i współaut. 2000). Ponadto w mtDNA występują sekwencje homologiczne z DNA jądrowym i chloroplastowym, co może być dowodem na wymianę informacji genetycznej między organellami w trakcie ewolucji.

Istotną cechą genomu mitochondrialnego jest obecność małych sekwencji powtórzonych (ang. small repeated sequence) o długości od 10 do 1000 pz (CONKLIN i HANSON 1994, NISHIZAWA i współaut. 2000) oraz dużych sekwencji powtórzonych (ang. large repeated sequence) o długości od 1 do 14 kpz (IWAHASHI i współaut. 1992). Małe sekwencje powtórzone mogą występować stosunkowo licznie, ale rzadko uczestniczą w re-

kombinacjach prowadzących do duplikacji i delecji fragmentów mtDNA. Duże sekwencje powtórzone występują najczęściej w dwóch, trzech kopiach, i ze względu na swoje rozmiary mogą aktywnie uczestniczyć w rekombinacjach homologicznych. Konsekwencją tego zjawiska jest powstawanie form izomerycznych chromosomu głównego, w których następuje inwersja fragmentu mtDNA, lub tworzenie się różnej liczby mniejszych cząstek kolistych o łącznej wielkości odpowiadającej długości chromosomu głównego. Rekombinacja homologiczna dużych sekwencji powtórzonych jest procesem odwracalnym, a uczestniczące w niej cząsteczki mtDNA są w stanie równowagi dynamicznej. Model strukturalny zakładający występowanie genomu mitochondrialnego w postaci subgenomowych cząstek został zaproponowany m. in. dla petunii

(FOLKERTS i HANSON 1991), fasoli zwyczajnej (JANSKA i MACKENZIE 1993) i kukurydzy (FAURON i współaut. 1995). UNSELD i współaut. (1997), uwzględniając obecność dwóch dużych sekwencji powtórzonych przyjęli, że w wyniku ich rekombinacji może nastąpić rearanżacja chromosomu głównego *Arabidopsis* prowadząca do powstania jego trzech, strukturalnie różniących się postaci oraz dwóch subgenomowych cząsteczek. KUBO i współaut. (1999) identyfikując w mtDNA buraka cukrowego trzy kilkukopijne duże sekwencje powtórzone, z których jedna występowała w przeciwnej orientacji do pozostałych, zaproponowali konfigurację sterylnego genomu mitochondrialnego złożoną z chromosomu głównego wielkości 481,9 kpz oraz dwóch cząsteczek kolistych wielkości 184,9 i 296,9 kpz.

MOLEKULARNE UWARUNKOWANIA CECHY CMS

Identyfikacja regionów mtDNA związanych z cechą CMS stała się możliwa dzięki porównaniu genomów roślin płodnych i męskosterylnych przy wykorzystaniu enzymów re-

strykcyjnych i analiz hybrydyzacyjnych z sondami molekularnymi. Różnice strukturalne, uwidaczniające się w odmiennych profilach restrykcyjnych, były obserwowane dla wielu ga-

Tabela 1. Geny obecne w genomie mitochondrialnym roślin – na podstawie sekwencji mtDNA *Arabidopsis* (UNSELD i współaut. 1997) i buraka cukrowego (KUBO i współaut. 2000).

Podjednostki łańcucha oddechowego	Geny
kompleks I NADH-dehydrogenazy	<i>nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6, nad7, nad9</i>
kompleks III cytochromu b	<i>cob</i>
kompleks IV - oksydazy c cytochromowej	<i>cox1, cox2, cox3</i>
kompleks V F ₀ – F ₁ ATPazy cytochrom c	<i>atp1(atp4), atp6, atp8, atp9, ccb206, ccb228, ccb438, ccb577</i>
Białka aparatu translacyjnego	
rybosomalny RNA 5S, 18S, 26S	<i>rrn5, rrn18, rrn26</i>
białka rybosomalne:	
mała podjednostka	<i>rps1, rps3, rps7, rps12, rps13, rps14, rps19</i>
duża podjednostka	<i>rpl2, rpl5, rpl16</i>
transferowy RNA	co najmniej 16 genów
otwarte ramki odczytu (orf)	
	co najmniej 10 orf koduje specyficzne białka mitochondrialne (85 orf dla <i>Arabidopsis</i> i 559 orf dla buraka cukrowego)

tunków roślin (WEIHE i współaut. 1991, STEINBORN i współaut. 1993, SKUZA 2000). W celu ustalenia związku między obecnością fragmentów restrykcyjnych specyficznych dla roślin CMS a organizacją konkretnych sekwencji kodujących, zastosowano metodę hybrydyzacji produktów trawień mtDNA z sondami homologicznymi lub heterologicznymi. Różniące się profile hybrydyzacyjne wskazały na inną organizację określonych genów mitochondrialnych. Zmiany tego typu stwierdzono dla wielu gatunków roślin w obrębie *coxI*, *coxII*, *atpA*, *atp6*. HORN (2002) badając organizację mtDNA wśród 28 typów sterylnych słoneczników zaobserwował zmiany w regionach *atp6*, *atp9*, *cob*, *coxI*, *coxII* i *coxIII*, przy czym poszczególne typy wykazywały także między sobą polimorfizm profili hybrydyzacyjnych. Dla sterylnych roślin kukurydzy typu C różnice profili opisano w regionach genów *atp6*, *atp9* i *coxII* (FRAGOSO i współaut. 1989), a dla sterylnych buraków cukrowych w obszarach *atpA*, *atp6* i *coxII* (XUE i współaut. 1994, SADOCH i współaut. 2003). Typowe profile restrykcyjne i hybrydyzacyjne dla mtDNA płodnych i męskosterylnych buraków cukrowych przedstawiono na Ryc. 5.

Analiza genów skorelowanych z cechą CMS wykazała, że ich sekwencje nukleotydowe ulegają rearanzacji w regionach kodujących lub flankujących. Sytuację taką udokumentowano dla genów *atpA*, *atp6*, *atp9* i *coxII* w mitochondriach sterylnych roślin buraka cukrowego (XUE i współaut. 1994, SENDA i współaut. 1991), ryżu (IWABUCHI i współaut. 1993) i słonecznika (CANAL i współaut. 2001).

W niektórych roślinach CMS zidentyfikowano transkrypcyjnie aktywny, unikalny typ genów, tzw. geny chimeryczne, będące produktami rekombinacji złożonymi z fragmentów sekwencji kodujących lub flankujących podstawowych genów mitochondrialnych i niezidentyfikowanych sekwencji orf. Geny chimeryczne mogą odpowiadać za powstawanie białek, które zakłócają prawidłowy proces produkcji pyłku.

Gen chimeryczny petuni *S-pcf* zawiera część 5' sekwencji podjednostki 9 ATPazy, fragmenty I i II eksonu II podjednostki oksydazy cytochromowej oraz niezidentyfikowanej sekwencji typu orf-*urfS* (HANSON 1991). W przypadku rzepaku znaleziono trzy regiony związane ze sterylnością typu *pol*, *nap* lub *ogu* (MENASSA i współaut. 1999). Dwa z nich zawierają geny chimeryczne: *orf224* i *orf138*. W

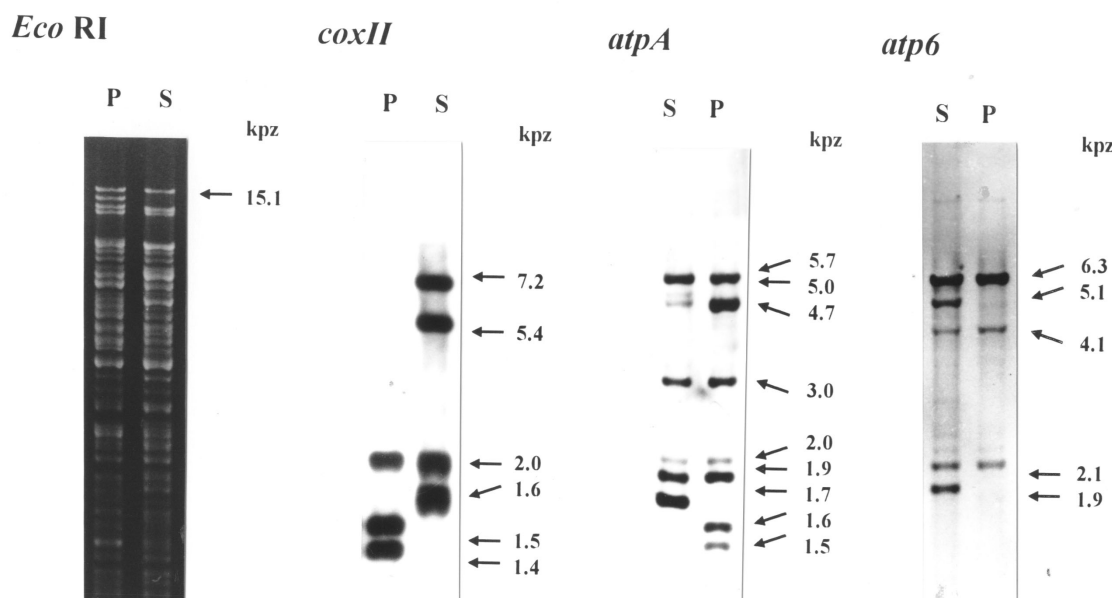
skład regionu skorelowanego z CMS typu *pol* wchodzi gen *orf224*, którego niekodująca sekwencja 5' i pierwsze 58 kodonów odpowiada genowi ósmej podjednostki ATPazy, natomiast *orf138* odpowiada za sterylność typu Ogura. Analiza roślin słonecznika PET1 wiąże cechę CMS z inwersją wielkości 12 kpz oraz insercją wielkości 5 kpz, obejmującą od strony 3' *atpA* gen chimeryczny *orfH522* (KÖHLER i współaut. 1991). W mtDNA kukurydzy są obecne sekwencje, które mogły brać udział w rekombinacjach genomu mitochondrialnego prowadzących do utworzenia obszaru odpowiedzialnego za CMS typu T. Znajdują się w nim dwie ramki odczytu: *urf13* i *orf221*. Gen *urf13* jest chimeryczny, zawiera fragmenty 3' sekwencji flankującej i kodującej genu 26S *rRNA*, podjednostkę 6 ATPazy oraz sekwencje nieznanego pochodzenia. Geny *urf13* i *orf221* ulegają kotranskrypcji (LEVINGS 1993). Dla sterylnej kukurydzy typu C ustalono związek między sterylnością pyłku a występowaniem genów chimerycznych zawierających podjednostki 9 i 6 ATPazy oraz podjednostkę II oksydazy cytochromowej. Dla kukurydzy typu S zidentyfikowano dwie otwarte ramki odczytu o charakterze chimerycznym – *orf355* i *orf77* – jako odpowiedzialne za ujawnianie się cechy niepłodności pyłku (ZABALA i współaut. 1997). Gen *orf355* zawiera sekwencję podobną do regionu R1 mitochondriów roślin płodnych połączoną 336 nukleotydami nieznanego pochodzenia. Gen *orf77* składa się z sekwencji kodującej genu *atp9* oraz fragmentów 3' sekwencji flankującej genu *orf221*, charakterystycznego dla cytoplazmy T kukurydzy.

Możliwość wyjaśnienia molekularnych podstaw CMS wiąże się z poznaniem struktury transkryptów i funkcji białek specyficznych dla roślin sterylnych. Badania ekspresji genów mitochondrialnych w roślinach płodnych i sterylnych wskazały na istnienie różnic w strukturze syntetyzowanych cząsteczek RNA, jednak nie wszystkie ujawnione zmiany mają związek z cechą CMS. Przykładem jest analiza transkryptów sześciu genów mitochondrialnych buraka cukrowego (*coxI*, *coxII*, *atpA*, *atp6*, *rps3* i *orf324*), która wykazała zmiany w profilach RNA dla linii sterylnej w stosunku do płodnej (KUBO i współaut. 1999), ale jedynie dla genu *coxI* różnice transkrypcyjne były wykrywalne w tkankach kwiatu.

Na podstawie badań immunochemicznych zidentyfikowano szereg białek – produktów genów chimerycznych. Produktem genu

orf522, związanego ze sterylnością typu PET1 słonecznika, jest białko o masie 15 kDa (HORN i współaut. 1991), a genu *orf 138* sterylnej rzodkiewki – białko o ciężarze 20 kDa (KRISHNASAMY i MAKAROFF 1994). Najlepiej poznanym peptydem związanym z cechą CMS jest URF13 o masie 13 kDa, obecny w sterylnych roślinach kukurydzy typu T (LEVINGS 1993). Jest on syntetyzowany we wszystkich organach rośliny, lecz wykazuje specyficzną toksyczność tylko w pylnikach. Pod wpływem białka URF13 następuje rozprzęgnięcie fosforyzacji oksydacyjnej, zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej oraz zahamowanie procesów oddechowych. W przypadku petunii wykazano, że z cechą CMS skorelowany jest produkt genu *pcf* – białko o masie 25 kDa, występujące tylko w sterylnych roślinach (NIVISON i HANSON 1989). Genom mitochondrialny żyta zawiera otwartą ramkę odczytu – *pol-r* – kodującą białko wysoce homologiczne do polimerazy DNA-B kukurydzy. Sekwencje *orf* odmiany płodnej i CMS są takie same w obszarze 864 pz od końca 5', natomiast końce 3' mają inną długość. W rezultacie tworzone są dwa różne poli-peptydy o wielkości 289 i 312 aminokwasów (SKUZA 2000).

mowanie procesów oddechowych. W przypadku petunii wykazano, że z cechą CMS skorelowany jest produkt genu *pcf* – białko o masie 25 kDa, występujące tylko w sterylnych roślinach (NIVISON i HANSON 1989). Genom mitochondrialny żyta zawiera otwartą ramkę odczytu – *pol-r* – kodującą białko wysoce homologiczne do polimerazy DNA-B kukurydzy. Sekwencje *orf* odmiany płodnej i CMS są takie same w obszarze 864 pz od końca 5', natomiast końce 3' mają inną długość. W rezultacie tworzone są dwa różne poli-peptydy o wielkości 289 i 312 aminokwasów (SKUZA 2000).



Ryc. 5. Analiza RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism) mtDNA z roślin sterylnych (S) i płodnych (P) buraka cukrowego.

Fragmenty restrykcyjne mtDNA trawionego enzymem *EcoRI* poddano hybrydyzacji z sondami homologicznymi zawierającymi częściowe sekwencje genów *coxII*, *atpA* i *atp6*. Wielkość charakterystycznych fragmentów restrykcyjnych oraz sygnałów hybrydyzacyjnych podano w tysiącach par zasad. W mtDNA roślin CMS – po trawieniu restryktazą *EcoRI* – stwierdzono, w porównaniu do mtDNA roślin płodnych, brak fragmentu wielkości 15.1 kpz. W wyniku hybrydyzacji z sondą *coxII* pojawiły się dodatkowe prążki hybrydyzacyjne wielkości 7.2, 5.4 i 1.6 kpz, a nie hybrydyzowały fragmenty wielkości 1.5 i 1.4 kpz. Dla sondy *atpA* stwierdzono dla roślin CMS dodatkowe sygnały 5.0 i 1.7 kpz, brak natomiast sygnałów odpowiadających fragmentom 1.6 i 1.5 kpz. Z sondą *atp6* hybrydyzowały dodatkowo dwa fragmenty – 5.1 i 1.9 kpz (Fot. Z. Sadoch).

DLACZEGO CMS UJAWNIA SIĘ TYLKO W PYLNIKACH, A NIE W INNYCH ORGANACH ROŚLINNYCH?

Próby wytłumaczenia tego zjawiska objęły zarówno badania ekspresji genów mitochondrialnych, jak również pomiary poziomu

ATP i analizy aktywności enzymów w tkankach roślin płodnych i sterylnych. Założeniem był fakt, że różnicujące się pylniki, a w szczeg-

ólności komórki linii haploidalnej (płciowej), charakteryzują się bardzo wysokim wymaganiami energetycznymi ze względu na liczne podziały komórkowe i replikację DNA, a także z uwagi na niezwykle szybki wzrost komórek w stosunkowo krótkim czasie. Potwierdzeniem powyższego przypuszczenia jest ok. 40-krotny wzrost liczby mitochondriów zachodzący w tapetum pylników kukurydzy i ok. 20-krotny wzrost w KMP, towarzyszące wczesnym stadiom różnicowania (LEE i WARMKE 1979). Ekspresja genów mitochondrialnych również rośnie drastycznie podczas określonych stadiów rozwoju pylnika. Wykazano szczególnie dużą akumulację transkryptów *atp1* w KMP i tapetum, zarówno w fazie premeiotycznej, jak też podczas męskiej mejozy słonecznika (SMART i współaut. 1994), petunii (CONLEY i HANSON 1994) i *Arabidopsis* (KALANTIDIS i współaut. 2002). Maksymalna ekspresja genów *cox* była

natomiast obserwowana w fazie postmeiotycznej (CONLEY i HANSON 1994, KALANTIDIS i współaut. 2002).

Badania zawartości ATP i ADP w organach kwiatowych petunii i tytoniu potwierdziły, że pylniki męskosterylne tych gatunków produkują znacznie mniej ATP, a tym samym charakteryzują się obniżoną proporcją ATP/ADP w stosunku do płodnych odpowiedników (LIU i DICKINSON 1989, BERGMAN i współaut. 2000). Koreluje to ze stwierdzoną, mniejszą aktywnością ATPazy w sterylnych pylnikach niektórych gatunków roślin (GUAN i współaut. 2001). Spośród innych enzymów mitochondrialnych, których aktywność podlega wyraźnemu spadkowi w pylnikach CMS, wymienić należy oksydazę cytochromową, co udokumentowano dla kukurydzy (OHMASA i współaut. 1976), petunii (BINO 1986) i buraka cukrowego (NAKASHIMA 1978).

GENY PRZYWRACAJĄCE PŁODNOŚĆ

Zastosowaniu linii męskosterylnych w hodowli odmian heterozyjnych może towarzyszyć pojawienie się w pokoleniu F1 roślin, które nie wytwarzają nasion. Jest to cechą niekorzystną wówczas, gdy istotnym dla rolnika jest plon nasion, tj. w przypadku rzepaku, kukurydzy lub słonecznika.

Płodność mieszańców pokolenia F1, a w konsekwencji możliwość otrzymania nasion, uwarunkowana jest odpowiednim współdziałaniem genomu mitochondrialnego i jądrowego. Molekularny mechanizm kontrolowania ekspresji genów mitochondrialnych związanych z cechą CMS wymaga udziału genów jądrowych przywracających płodność pyłku. Proces ten zachodzi przy udziale dominujących restorerów – *Rf* – i może być wynikiem supresji lub kompensacji sterylnego genomu mitochondrialnego. Analizy genetyczne i molekularne ujawniły dla niektórych gatunków roślin kilka różnych typów sterylnych mtDNA, przy czym każdy z typów wymaga kooperacji z właściwymi genami restorerami (SCHNABLE i WISE 1989).

W przypadku kukurydzy, dla każdej z trzech wyodrębnionych form CMS, zidentyfikowano różne geny przywracające płodność pyłku, które zlokalizowane są w innych chromosomach. Typ *cms-T* wymaga współdziałania z dwoma genami *Rf1* i *Rf2* zlokalizowanymi odpowiednio w chromosomach trzecim i dzie-

wiątym (DUVICK 1965, LEVINGS 1993). Gen *Rf3* w chromosomie trzecim jest restorerem dla formy *cms-S*, a z typem *cms-C* związany jest gen *Rf4* mapujący się w chromosomie ósmym (WEN i CHASE 1999). Spośród trzech znanych form cytoplazmy sterylnej rzepaku, dla dwóch – *nap* i *pol* – udało się wyselekcjonować linie o genotypach przywracających płodność, posiadające odpowiednio geny *Rfn* lub *Rfp* (FAN i STEFANSSON 1986, FANG i MCVETTY 1989). W większości systemów CMS w odtworzeniu płodności udział biorą jeden lub dwa *loci*, jakkolwiek są systemy, które wymagają współdziałania wielu genów jądrowych. W aspekcie praktycznej hodowli wykorzystywane i rozwijane są systemy CMS, w których ze sterylnymi mitochondriami kooperuje co najwyżej kilka genów restorerów.

Mechanizm przywracania płodności roślinom męskosterylnym wiąże się najczęściej ze zmianą ekspresji genów mitochondrialnych warunkujących sterylność pyłku, powodowaną działaniem restorerów. Wyjątkiem jest sytuacja w mtDNA fasoli, gdzie *pvs* związany z cechą CMS jest eliminowany z genomu w obecności jądrowego genu *Fr* (HE i współaut. 1995). Zmiana ekspresji genów mitochondrialnych odbywa się najczęściej posttranskrypcyjnie lub posttranslacyjnie. WISE i współaut. (1989) stwierdzili, że obecność genu jądrowego *Rf1* powoduje zmniejszenie zawartości

dwóch transkryptów genu *T-urf13* w sterylnych roślinach kukurydzy typu T. W wyniku tej zmiany następuje obniżenie o ok. 80% poziomu białka URF13 toksycznego dla pylników (KENNELL i PRING 1989).

Posttranskrypcyjne redagowanie RNA może także odgrywać rolę w przywracaniu płodności. Proces ten polega na wymianie cytozyny na uracyl, co bezpośrednio wpływa na powstawanie nowych kodonów „start” i „stop”, a tym samym na zmianę długości ORF związanych z cechą CMS (HERNOULD i współaut. 1998).

Interesujące jest, że zmiany w poziomie transkryptów oraz białek związanych z sterility mogą zachodzić tylko w niektórych organach rośliny. MENASSA i współaut. (1999) opisali różnice w poziomie transkryptu *orf224/atp6* obecnego w organach kwiatowych roślin męskosterylnego rzepaku typu *pol* i roślin z przywróconą płodnością. W wyniku działania genu jądrowego *Rfp* zawartość transkryptu *orf224/atp6* obniża się szczególnie wyraźnie w płatkach korony, słupkach i w pylnikach.

TWORZENIE ROŚLIN CMS METODAMI INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Rośliny męskosterylne, ze względu na szerokie zastosowanie w pracach hodowlanych, są obecnie tworzone w laboratoriach, przy wykorzystaniu co najmniej kilku metod inżynierii genetycznej:

(1) posttranskrypcyjne wyciszanie genów w roślinach transgenicznym za pomocą konstruktów genowych zawierających sekwencje antysensowne w stosunku do badanych, działające pod promotorami specyficznymi dla pylnika lub tapetum (GOETZ i współaut. 2001, PEREZ-PRAT i VAN LOOKEREN CAMPAGNE 2002). W większości przypadków prace te dotyczą jednak genów jądrowych, chociaż ekspresja fenotypowa męskiej sterility zachodzi oczywiście w pylnikach;

(2) posttranskrypcyjne wyciszanie genów mitochondrialnych za pomocą konstruktów zawierających sekwencje antysensowne w stosunku do odpowiednich genów mtDNA, działające pod promotorami specyficznymi dla tapetum. Przykładem może być zablokowanie ekspresji dehydrogenazy pirogronianowej w tapetum pylnikowym tytoniu, czego wynikiem jest nadmierna wakuolizacja i rozrost tapetum oraz zaburzenia w formowaniu ściany mikrospor (YUI i współaut. 2003). Jako modyfikację tej metody można uznać transformację mitochondriów tytoniu niezredagowaną formą *atp9* cDNA. Ekspresja transgeny prowadzi do akumulacji nienormalnych transkryptów RNA, a następnie syntezy niefunkcjonalnych białek i zaburzenia procesu mikrosporigenezy (HERNOULD i współaut. 1998);

(3) transformacja roślin konstruktami zawierającymi geny chimeryczne, działające pod promotorami specyficznymi dla pylnika

(MARIANI i współaut. 1991), czy nawet pod promotorem specyficznym dla męskich gamet (SINGH i współaut. 2003). Znane są też przypadki kosupresji genów specyficznych dla tapetum działających pod promotorem 35S wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 35S), powodującej śmierć komórek tapetum i zaburzenia w rozwoju ściany ziaren pyłkowych petunii (KAPOOR i współaut. 2002);

(4) asymetryczna fuzja protoplastów, tzw. cybrydyzacja, czyli łączenie genomu jądrowego jednego gatunku z genomem cytoplazmatycznym (mitochondria, chloroplasty) drugiego gatunku lub linii genetycznej. W ten sposób przeniesiono mitochondria z roślin CMS do roślin płodnych, wprowadzając tym samym cechę niepłodności pyłku do nowych linii czy odmian (SAKAI i IMAMURA 1990, WALTERS i współaut. 1992, AKAGI i współaut. 1995). Inną możliwość to uzyskiwanie za pomocą tej techniki zupełnie nowych roślin CMS, wykazujących unikalną organizację mtDNA. Przykładem może być fuzja genomu jądrowego pomidora (*Lycopersicon esculentum*) i genomu mitochondrialnego ziemniaka (*Solanum tuberosum* lub *Solanum acule*), w wyniku której otrzymano szereg roślin cybrydowych o fenotypie pomidora, charakteryzujących się zróżnicowanym poziomem ekspresji cechy CMS. Wykazują one obecność licznych rekombinacji w obrębie mtDNA, czego wynikiem było utworzenie kilku nowych genomów, różniących się organizacyjnie od mtDNA form rodzicielskich (MELCHERS i współaut. 1992). Znane są również męskosterylne odmiany tytoniu, które powstały w wyniku połączenia jąder *Nicotiana tabacum* i cytoplazmy innych gatun-

ków rodzaju *Nicotiana*, i charakteryzują się obecnością wielu transkryptów mitochon-

drialnego genu *atp1*, nie spotykanych w roślinach płodnych (BERGMAN i współaut. 2000).

CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF PLANTS – BIOLOGICAL AND MOLECULAR MECHANISMS

S u m m a r y

Cytoplasmic male sterility (CMS), the trait resulting in the formation of non-functional microspores or pollen grains, is commonly used by plant breeders for hybrid seeds production. Numerous studies aimed at the explanation of both biological and molecular mechanisms leading to the pollen abortion have been carried out in the past thirty years. Among the cytological events accompanying CMS, the most pronounced one concerns the tapetum – tissue surrounding differentiating pollen mother cells (PMC) – and involves its abnormal vacuolization, fusion of cells into multinuclear syncytia, and disturbances in the time of the programmed tapetum death. Development of PMC, depending upon the species, is arrested either during meiosis or in postmeiotic phase, and is usually related to the failure in the deposition of the microspore (pollen) wall. Ultrastructural and morphometric analysis clearly showed that mitochondria in both tapetum and PMC are seriously affected in CMS plants, which is reflected in changes of their number, size and structure.

Molecular analyses indicated that several structural features of mitochondrial DNA (mtDNA) might be related to CMS expression. The results of RFLP studies and of hybridizations with specific mitochondrial probes revealed, that the organization of several genes such as *atpA*, *atp6*, *atp9*, *coxI*, *coxII*, *coxIII* and *cob* is different in sterile plants in comparison with their fertile counterparts. Despite that the altered mitochondrial organization typifies all plant tissues, the disturbances in development could only be detected in anthers. This probably results from exceptionally high energetic demand of anther tissues due to the numerous subsequent cell divisions accompanied by several cycles of DNA replication.

The wide interest of breeders in the application of CMS plants led to the development of several techniques of male sterility induction, including the production of transgenic plants with altered expression of either nuclear or mitochondrial genes, the transfer of mitochondria from sterile to fertile plants, and formation of new "cybrid" plants with rearranged mtDNA.

LITERATURA

- AKAGI H., TAGUCHI T., FUJIMURA T., 1995. *Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion*. Theor. Appl. Genet. 91, 563–567.
- BACKERT S., NIELSEN B. N., BÖRNER T., 1997. *The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants*. Trends Plant Sci. 2, 477–583.
- BERGMAN P., EDQVIST J., FARBOS I., GLIMELIUS K., 2000. *Male-sterile tobacco display abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio*. Plant Mol. Biol. 42, 531–544.
- BINO R. J., 1985. *Ultrastructural aspects of cytoplasmic male sterility in *Petunia hybrida**. Protoplasma 127, 230–240.
- BINO R. J., 1986. *Cytoplasmic male sterility in *Petunia hybrida*: A structural and histochemical analysis*. Rozprawa doktorska, University of Wageningen, The Netherlands.
- BROWN G. G., ZHANG M., 1995. *Mitochondrial plasmids: DNA and RNA*. [W:] *Molecular Biology of Plant Mitochondria*. LEVINGS C. S. III, VASIL I. K. (red.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 61–91.
- CANAL DE LA L., CROUZILLAT D., QUITIER F., LEDOIGT G., 2001. *A transcriptional alternation on the *atp9* is associated with a sunflower male-sterile cytoplasm*. Theor. Appl. Genet. 102, 1185–1189.
- CONKLIN P. L., HANSON M. R., 1994. *Recombination of plant mitochondrial genomes*. [W:] *Homologous recombination and gene silencing in plants*. PASZKOWSKI J. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 61–68.
- CONLEY C., HANSON M., 1994. *Tissue-specific protein expression in plant mitochondria*. Plant Cell 6, 85–91.
- DUVICK D. N., 1965. *Cytoplasmic pollen sterility in corn*. [W:] *Advances in Genetics*. Caspari E. W., Thoday J. (red.). Academic Press, New York, 13, 1–56.
- FAN Z., STEFANSSON B. R., 1986. *Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male sterility systems in rape (*Brassica napus* L.)*. Can. J. Plant Sci. 66, 21–227.
- FANG G. H., MCVETTY P. B. E., 1989. *Inheritance of male fertility restoration and allelism of restorer genes for the Polima cytoplasmic male sterility system in oilseed rape*. Genome 32, 1044–1047.
- FAURON C., CASPER M., GAO Y., MOORE B., 1995. *The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional*. Trends Genet. 11, 228–235.
- FOLKERTS O., HANSON M., 1991. *Three copies of a single recombination repeat occur on the 443-kb master circle of the *Petunia hybrida* 3704 mitochondrial genome*. Nucleic Acids Res. 17, 7345–7357.
- FRAGOSO L., NICHOLS S. E., LEVINGS C. S., 1989. *Rearrangements in maize mitochondrial genes*. Genome 31, 160–168.

- GOETZ M., GODT D. E., GUIVARCH A., KAHMANN U., CHRIQUI D., ROITSCH T., 2001. *Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply*. PNAS 98, 6522–6527.
- GUAN H. X., ZHU Y. G., LAN S. Y., XU Z. X., 2001. *Ultrastructural localization of ATPase activity in fertile and sterile anther of rice (Oryza sativa L. cv. Marxie)*. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao 34, 323–327.
- HANSON M. R., 1991. *Plant mitochondrial mutations and male sterility*. Annu. Rev. Genet., 1, 173–179.
- HE S., LYZNIK A., MACKENZIE S., 1995. *Pollen fertility restoration by nuclear gene Fr in CMS bean: nuclear-directed alteration of a mitochondrial population*. Genetics 139, 995–962.
- HERNOULD M., SUHARSONO, ZABALETA E., CARDE J.P., LITVAK S., ARAYA A., MOURAS A., 1998. *Impairment of tapetum and mitochondria in engineered male-sterile tobacco plants*. Plant. Mol. Biol. 36, 499–508.
- HORN R., KÖHLER R. H., ZETSCHKE K., 1991. *A mitochondrial 16-kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower*. Plant. Mol. Biol. 7, 29–36.
- HORN R., 2002. *Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasms in the genus Helianthus*. Theor. Appl. Genet. 104, 562–570.
- HORNER H. T., ROGERS M. A., 1974. *A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (Capsicum annuum)*. Can. J. Bot. 3, 435–441.
- 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.
- IWAHASHI M., NAKAZONO M., KANNO A., SUGINO K., ISCHIBASHI T., HIRAI A., 1992. *Genetic and physical maps and clone bank of mitochondrial DNA from rice*. Theor. Appl. Genet. 84, 275–279.
- JANSKA H., MACKENZIE S. A., 1993. *Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility*. Genetics 135, 869–879.
- KALANTIDIS K., WILSON Z. A., MULLIGAN B. J., 2002. *Mitochondrial gene expression in stamens is differentially regulated during male gametogenesis in Arabidopsis*. Sex. Plant Reprod. 14, 229–304.
- KAPOOR S., KOBAYASHI A., TAKATSUJI H., 2002. *Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia*. Plant Cell 14, 2353–2367.
- KAUL M. L. H., 1988. *Male sterility in higher plants*. [W:] Monographs on theoretical and applied genetics. FRANKEL R., GROSSMANN M., LISKENS H. F., MALIGA P., RILEY R. (red.). Springer Berlin Heidelberg New York, 132–169.
- KENNEL J. C., PRING D. R., 1989. *Initiation and processing of atp6, T-urf13 and orf 221 transcripts from mitochondria of T cytoplasm maize*. Mol. Gen. Genet. 216, 16–24.
- KÖHLER R. H., HORN R., LÖSSL A., ZETSCHKE K., 1991. *Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with atpA gene*. Mol. Gen. Genet. 227, 369–376.
- KRISHNASAMY S., MAKAROFF C. A., 1994. *Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish*. Plant Mol. Biol. 26, 935–946.
- KUBO T., NISHIZAWA S., MIKAMI T., 1999. *Alterations in organization and transcription of the mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Mol. Gen. Genet. 262, 283–290.
- KUBO T., NISHIZAWA S., SUGAWARA A., ITCHODA N., ESTIATI A., MIKAMI T., 2000. *The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (Beta vulgaris L.) reveals a novel gene for tRNA^{Cys} (GCA)*. Nucleic Acid Res. 28, 2571–2576.
- LASER K. D., LERSTEN N. R., 1972. *Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms*. Bot. Rev. 3, 425–454.
- LEE S. J., WARMKE H. E., 1979. *Organelle size and number of fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn*. Am. J. Bot. 66, 141–148.
- LEVINGS III CH. S., 1993. *Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize*. Plant Cell 5, 1285–1290.
- LIU X. C., DICKINSON H. G. 1989. *Cellular energy levels and their effect on male cell abortion in cytoplasmically male sterile lines of Petunia hybrida*. Sex. Plant Reprod. 2, 167–172.
- MAJEWSKA-SAWKA A., JASSEM B., MACEWICZ J., RODRIGUEZ GARCIA M. I., 1990. [W:] *Polen, Esporas y Sus Aplicaciones. An electron microscopic study of anther structure in male-fertile and male-sterile sugar beets: tapetum development*. BLANCA G., RODRIGUEZ-GARCIA M. I. (red.) 57–63.
- MAJEWSKA-SAWKA A., RODRIGUEZ-GARCIA M.I., NAKASHIMA H., JASSEM B., 1993. *Ultrastructural expression of cytoplasmic male sterility in sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Sex. Plant Reprod. 6, 22–32.
- MARIANI C., GOLDBERG R. B., LEEMANS J., 1991. *Engineered male sterility in plants*. Symp. Soc. Exp. Biol. 45, 271–279.
- MELCHERS G., MOHRI Y., WATANABE K., WAKABAYASHI S., HARADA K., 1992. *One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated Solanum protoplasts*. PNAS 89, 6832–6836.
- MENASSA R., L'HOMME Y., BROWN G. G., 1999. *Post-transcriptional and developmental regulation of a CMS-associated mitochondrial gene region by a nuclear restorer gene*. Plant J. 17, 491–499.
- NAKASHIMA H., 1978. *Physiological and morphological studies on the cytoplasmic male sterility of some crops*. J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. 59, 17–58.
- NISHIZAWA S., KUBO T., MIKAMI T., 2000. *Variable tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets*. Curr. Genet. 37, 34–38.
- NIVISON H. T., HANSON M. R., 1989. *Identification of a mitochondrial protein associated with male sterility in petunia*. Plant Cell 1, 1121–1130.
- OHMASA M., WATANABE Y., MURATA N., 1976. *A biochemical study of cytoplasmically male-sterility in corn. Alternation of cytochrome oxidase and malate de-*

- hydrogenase activities during pollen development*. Jap. J. Breed. 26, 40–50.
- OVERMAN M. A., WARMKE H. E., 1972. *Cytoplasmic male sterility in sorghum. II. Tapetal behavior in fertile and sterile anthers*. J. Hered. 63, 227–234.
- PEREZ-PRAT E., VAN LOOKEREN CAMPAGNE M. M., 2002. *Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants*. Trends Plant Sci. 7, 199–203.
- PRING D. R., LONSDALE D. M., 1985. *Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA*. Int. Rev. Cytol. 97, 1–46.
- SADOCH Z., GOC A., WIERZCHOSŁAWSKI R., DALKE L., 2003. *Cytoplasmic male sterility in hybrids of sterile wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) and O-type fertile sugar beet (*Beta vulgaris* L.): molecular analysis of mitochondrial and nuclear genomes*. Mol. Breed 11, 137–148.
- SAKAI T., IMAMURA J., 1990. *Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion*. Theor. Appl. Genet. 80, 421–427.
- SCHNABLE P. S., WISE R. P., 1989. *The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration*. Trends Plant Sci. 3, 175–180.
- SCHUSTER W., BRENNICKE A., 1994. *The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 61–78.
- SCOLES G. J., EVANS L. E., 1979. *Pollen development in male-fertile and cytoplasmic male-sterile rye*. Can. J. Bot. 57, 2782–2790.
- SENDA M., HARADA T., MIKAMI T., SAGIURA M., KINOSHITA T., 1991. *Genomic organization and sequence analysis of the cytochrome oxidase subunit II gene from normal and male-sterile mitochondria in sugar beet*. Curr. Genet. 19, 175–181.
- SINGH M., BHALLA P. L., XU H., SINGH M. B., 2003. *Isolation and characterization of a flowering plant male gametic cell-specific promoter*. FEBS Letters 8, 47–52.
- SKUZA L. J., 2000. *Charakterystyka molekularna mitochondrialnego DNA żyta uprawnego (*Secale cereale* L.)*. Post. Biol. Kom. 27, 185–196.
- SMART C. J., MONEGER F., LEAVER C. J., 1994. *Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower*. Plant Cell 6, 811–825.
- STEINBORN R., SCHWABE W., WEIHE A., ADOLF K., MELZ G., BÖRNER T., 1993. *A new type of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.): analysis of mitochondrial DNA*. Theor. Appl. Genet. 85, 822–824.
- UNSELD M., MARIENFELD J. R., BRANDT P., BRENNICKE A., 1997. *The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides*. Nature Genet. 15, 57–61.
- WALTERS T. W., MUTSCHLER M. A., EARLE E., 1992. *Protoplast fusion-derived Ogura male sterile cauliflower with cold tolerance*. Plant Cell Rep. 10, 624–628.
- WEIHE A., DUDAREVA N. A., VEPREV S. G., MALETSKY S. I., MELZER R., SALGANIK R. I., BÖRNER TH., 1991. *Molecular characterization of mitochondrial DNA of different subtypes of male-sterile cytoplasms of the sugar beet *Beta vulgaris* L.* Theor. Appl. Genet. 82, 11–16.
- WEN L., CHASE CH. D., 1999. *Pleiotropic effects of a nuclear restorer of fertility locus on mitochondrial transcripts in male-fertile and S male sterile maize*. Curr. Genet. 35, 521–526.
- WISE R. P., WILL C. L., SCHNABLE P. S., 1989. *Mutator - induced mutations of the rf1 nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of T-rf13 mitochondrial transcripts*. Genetics 143, 1383–1394.
- XUE Y., COLLIN S., DAVIES D. R., THOMAS C. M., 1994. *Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpA* loci*. Plant Mol. Biol. 25, 91–103.
- YUI R., IKETANI S., MIKAMI T., KUBO T., 2003. *Antisense inhibition of mitochondrial purvate dehydrogenase E1alpha subunit in anther tapetum causes male sterility*. Plant J. 34, 57–66.
- ZABALA G., GABAY-LAUGHNAN S. J., LAUGHNAN J. R., 1997. *The nuclear gene Rf3 affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R implicated in S-type male sterility in maize*. Genetics 147, 847–1136.