

УДК 575.24

Хлорофильные мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозо-N-метилмочевинной и особенности их наследования

I. Пестролистные химеры

Усатов А. В., Колоколова Н. С., Рожкова О. К., Усатова О. А.,
Чеснокова Н. А., Федорова М. А., Усатов Н. А., Плотников В. Г.

Аннотация:

Проведен физиолого-генетический анализ пестролистных химер *variegated* из коллекции хлорофильных мутантов подсолнечника Южного федерального университета. Все анализируемые мутанты, растения которых в течение нескольких десятилетий, наследуют с различной степенью выраженности, хлорофильные дефекты были получены на генетической основе одной инбредной линии с помощью индуцированного нитрозометилмочевинной мутагенеза. На основании полученных результатов: постоянное соматическое расщепление, однородительское материнское наследование мутантного признака, сниженное содержание в мутантной ткани хлорофиллов и каротиноидов, изменения внутренней структуры пластид, наличие на границе между нормальными и мутантными тканями гетеропластидных клеток сделан вывод о пластидной природе хлорофильных мутаций у пестролистных форм подсолнечника.

Ключевые слова: *подсолнечник, N- нитрозометилмочевинной, хлорофильные мутации, пластиды, пестролистные формы.*

Sunflower Chlorophyll Mutations Induced by N-Nitrosomethylurea and Character of Its Inheritance

I. Variegated Mutants

Usatov A.V., Kolokolova N.S., Rogkova O.K., Usatova O.A., Chesnokova N.A., Fedorova M.A., Usatov N. A., Plotnikov V.G.

Abstract:

Variegated mutants of the sunflower chlorophyll mutant collection of Southern federal university were studied. Its uniqueness consists in the fact that it was worked out on the base of one inbred line. Secondly, only one mutagen (N-nitrosomethylurea) was used for mutation inductions. Variegated mutants are

characterized by leaves having white, yellow and yellow-green sectors of the various sizes and forms. Chlorophyll deficient sectors may be caused by some reasons in green plants. However, long-term researches of induced variegated mutants showed that they met the classic criteria of plastid inheritance. They are characterized by permanent somatic segregation, one-parental maternal inheritance of mutant character, defects of plastid structure and functions, presence of heteroplastid cells on the borderline between normal and mutant tissues.

Keywords: *sunflower, N-nitrosomethylurea, chlorophyll mutations, plastids, variegated forms.*

Введение

В результате многолетних исследований НММ-мутагенеза подсолнечника, в нашей лаборатории были выявлены некоторые закономерности индукции хлорофильных мутаций, различной генетической природы. Установлено, что НММ в концентрациях 0,01% и 0,015% эффективно индуцирует внеядерные хлорофильные мутации (Усатов и др., 1995). Повышение концентрации до 0,02% приводит к индукции не только пластидных, но и ядерных хлорофильных мутаций (Белецкий, 1989). Мутаген в концентрации 0,03% вызывает крупные структурные перестройки ядерного генетического материала, которые регистрируются как абберрации хромосом (Гуськов и др., 2001).

В настоящее время в Южном федеральном университете создана уникальная коллекция хлорофильных мутантов подсолнечника (Усатов и др., 2004; Усатов и др., 2010). Уникальность коллекции заключается в том, что хлорофильные мутации, различной генетической природы выделены после обработки в различных режимах N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) семян или проростков одной инбредной линии. В данном сообщении приведен физиолого-генетический анализ коллекционных линий внеядерных пестролистных химеры *variegated*, растений которых в течение нескольких десятилетий наследуют с различной степенью выраженности хлорофильные дефекты.

Материалы и методы

Объектом исследований служили внеядерные мутанты коллекционных

линий пестролистных химер *variegated* (*var*), список которых приведен в конце статьи. Мутантные формы были выделены после обработки в различных режимах N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) подсолнечника линии 3629. Семена линии 3629 были любезно предоставлены нам А. И. Гундаевым в 1966 г. (получена автором из среднеспелой высокомасличной популяции подсолнечника ВНИИМК № 20044 в 1959 г.).

Растения выращивали на полях учебно-опытного хозяйства ЮФУ (п. Недвиговка). Почва – обыкновенный чернозем южно-европейской фации. Для выяснения генетической природы хлорофильных мутаций проводили реципрокные скрещивания мутантов с зелеными растениями линии 3629. Изучали $F_1 - F_3$ поколения. Методика проведения реципрокных скрещиваний общепринятая. Содержание хлорофиллов и каротиноидов в мутантных и зеленых тканях листьев пестролистных растений определяли методом (Гавриленко и др., 1975). В промерах в каждом варианте использовали не менее 20 растений. Статистическую значимость результатов оценивали по критерию Стьюдента (Бейли, 1973).

Результаты и их обсуждение

Фенотипически пестролистные формы подсолнечника мутантных линий *var*, в отличие от зеленых растений исходной линии 3629 (рис. 1), характеризуются наличием на листьях белых, желтых или желто-зеленых участков самых различных размеров и форм (рис. 2, 3).

Рисунок 1 — Растение инбредной линии 3629

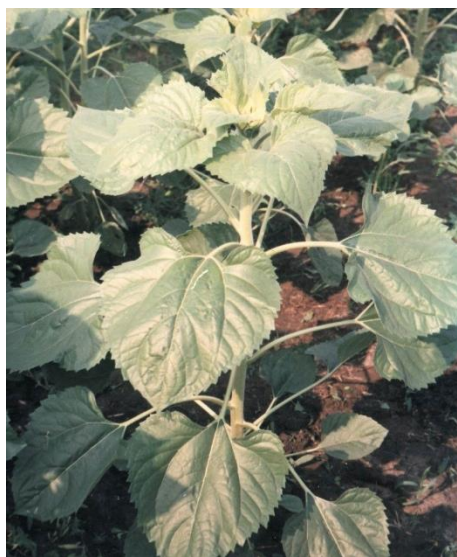


Рисунок 2 — Внеядерная хлорофильная химера variegated 11



Рисунок 3 — Внеядерная хлорофильная химера variegated 10



Иногда пестролистность у этого типа мутантов можно наблюдать уже на стадии семядолей, но чаще у первых и последующих настоящих листьев, где она сохраняется до их естественного отмирания, при этом граница между измененной и нормальной зеленой тканью листа четко выражена.

В таблице 1 приведены результаты расщепления в потомстве после самоопыления пестролистных растений мутантных линий *var*. Видно, что пестролистные растения всех изучаемых линий расщепляются в потомстве на три типа проростков: зелёные, пёстрые и летальные (белые или желтые). Последние погибают на стадии развития первой пары настоящих листьев.

Таблица 1 — Расщепление в потомстве пестролистных растений мутантных линий *var*

Линия	Количество растений в потомстве			Количество мутантных растений, %
	зеленых	пестрых	белых, жёлтых	
<i>Var - 1</i>	27	8	5	32,5
<i>Var - 2</i>	24	14	9	51,0
<i>Var - 3</i>	30	4	0	11,8
<i>Var - 4</i>	19	17	7	55,8
<i>Var - 6</i>	17	5	4	36,0
<i>Var - 7</i>	24	7	0	29,2
<i>Var - 8</i>	18	10	1	37,9
<i>Var - 9</i>	25	6	8	35,9
<i>Var - 10</i>	69	6	14	22,5
<i>Var - 11</i>	32	40	25	67,0
<i>Var - 12</i>	23	26	42	74,2
<i>Var - 13</i>	14	4	0	28,6
<i>Var - 14</i>	56	29	8	39,8
<i>Var - 15</i>	14	12	8	58,8
<i>Var - 17</i>	33	4	9	28,3
<i>Var - 20</i>	33	6	3	21,4
<i>Var - 23</i>	25	14	12	51,0
<i>Var - 24</i>	10	10	8	64,3
<i>Var - 25</i>	32	27	13	55,6

<i>Var</i> – 27	16	12	5	51,5
<i>Var</i> – 28	22	8	4	35,3
<i>Var</i> – 29	11	13	5	62,1
<i>Var</i> – 30	29	6	0	20,7
<i>Var</i> – 32	54	6	6	18,2
<i>Var</i> – 33	22	10	8	45,0
<i>Var</i> – 35	9	12	5	65,4
Σ	688	316	209	
%	57,8%	42,2 %		

Хотя числовые отношения при расщеплении непостоянны, однако они носят устойчивый, регулярно повторяющийся (на протяжении более 45 лет) характер, подтверждая генетическую непрерывность пластид в ряду клеточных поколений (табл. 2).

Таблица 2 — Расщепление в потомстве пестролистных растений мутантных линий var после самоопыления

Год наблюдения	Количество изученных семей	Количество растений в потомстве			Количество мутантных растений, %
		зеленых	пестрых	белых (желтых)	
1967	50	432	199	88	39,9
1968	60	1128	536	491	47,7
1969	53	1404	584	537	44,4
1970	59	1126	457	310	40,5
1972	69	1006	385	347	42,1
1973	61	1145	325	268	34,1
1974	72	1154	428	259	37,3
1976	51	1404	431	778	46,3
1977	66	927	261	772	52,6
2000*	15	556	267	192	45,2
2001*	15	547	227	162	41,6
2003*	15	461	283	126	47,1
2004*	15	395	201	179	49,0
2011*	15	457	183	158	42,7
2012*	15	411	137	117	38,2

Примечание: * - приведены результаты только по тем линиям пестролистных химер, которые были выделены в 1967 году.

Безусловно, возникновение пестролистности еще не является свидетельством пластидной природы этого признака. В основе появления бесхлорофильных секторов на зеленом растении могут лежать различные причины (Белецкий 1989).

Для доказательства однородительского материнского наследования мутантного признака были проведены реципрокные скрещивания пестролистных форм с растениями исходной линии 3629. В том случае, когда пестролистное растение опыляли пыльцой зеленых растений, гибридное потомство расщеплялось в F_1 как и при самоопылении (табл. 1). При обратном направлении скрещивания, то есть когда в качестве материнского растения использовали зеленое, а отцовским растением служила пестролистная форма, все потомство было зеленым и не расщеплялось в последующих поколениях (табл. 1.4). Следует отметить, что константными остается и потомство зеленых растений, возникающих в потомстве пестролистных химер.

Таблица 3 — Расщепление в потомстве реципрокных гибридов, полученных в результате скрещиваний пестролистных форм с растениями исходной линии 3629

Год опытов	Направление скрещивания	Кол-во растений в F_1			Кол-во мутантных растений, %
		зеленых	пестрых	белых (желтых)	
2011	пестрое x зеленое	273	132	92	45,1
	зеленое x пестрое	369	0	0	0
2012	пестрое x зеленое	211	89	66	42,4
	зеленое x пестрое	147	0	0	0

Имитацию материнской наследственности можно наблюдать при апомиксисе. Поскольку апомиксис иногда встречается у подсолнечника (Хохлов, 1967), был поставлен эксперимент по определению возможности к апомиктическому способу размножения растений исходной материнской линии и пестролистных форм. Для этого у цветков 20 зеленых растений 3629 и 40 пестролистных растений из различных линий *var* удаляли тычинки, и затем растения инцухтировали. Было обнаружено, что как у растений исходной линии, так и у пестролистных мутантов только в единичных

случаях апомиктично может образовываться незначительное количество плодов (не более 1-2 штук на корзинку).

Поскольку фенотипически мутантные растения отличаются от исходных зеленых, прежде всего окраской листьев (от белой до желто-зеленой), было проведено сравнительное исследование содержания хлорофиллов и каротиноидов. Визуально по окраске мутантной ткани пестролистные формы можно разбить на 3 группы (табл. 4). Зеленые растения с белыми участками содержат в белых секторах фактически следы хлорофиллов (0,2-3,0% от контроля) и каротиноидов (8-10% от контроля). Чуть больше пигментов у растений с желтыми секторами (содержание хлорофиллов в желтых секторах до 9%, каротиноидов – до 41% от контроля). В растениях с желто-зелеными пятнами содержание зеленых пигментов и каротиноидов в мутантной ткани достигает 36,7% и 87,6% от контроля соответственно. Зеленые участки по содержанию хлорофиллов приближаются к контрольным показателям или даже превышают их. Мы предполагаем, что поскольку мутантная ткань фотосинтетически не активна и поддерживается за счет зеленой части, снабжающей ее продуктами фотосинтеза, функциональная активность последней может повышаться, что мы часто, и наблюдаем в зеленых тканях пестролистных растений.

Таблица 4 — Содержание хлорофиллов a+b и каротиноидов в листовой ткани пестролистных растений подсолнечника в фазу бутонизации

Линия	Фенотип ткани	Содержание, мг/г абсолютно сухого веса			
		Хлорофиллы a+b		Каротиноиды	
		абс.	% от контр.	абс.	% от контр.
3629	зеленый	7,9±0,5	100	2,17±0,7	100
Var 9, 10, 17, 32	зеленый	7,60-8,80	96,2-111,3	2,01-3,12	92,6-143,8
	белый	0,02-0,24	0,2-3,0	0,14-0,20	6,5-9,2
Var 1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 20, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35	желтый	0,19-0,74	2,4-9,4	0,45-0,86	20,7-39,6
Var 3, 8, 12, 24	желто-зеленый	1,10-2,90	14,0-36,7	0,95-1,90	43,8-87,6

Для пластид в мутантных тканях характерны глубокие изменения ультраструктуры. Это, прежде всего частичное или полное отсутствие

тилакоидной системы в жёлтых и белых участках соответственно, а также изменение размеров и числа пластоглобул (Усатов и др. 2004). Отмеченные изменения ультраструктуры пластид, очевидно, связаны с ингибированием процесса образования ламеллярной системы в жёлто-белых секторах. Эти изменения коррелируют с вышеприведёнными данными по содержанию пигментов. О наличии тесной связи между развитостью тилакоидной системы и содержанием пигментов известно из ранних работ других исследователей (Уоддингтон, 1964).

Тест на соматическое расщепление потомства ещё со времён Э. Баура и К. Корренса является одним из чётких критериев пластомной обусловленности дефекта пластид. У высших растений этот тест широко применяется для анализа пластомно обусловленной пестролистности (Давыденко, 1984). Тест основан на явлении сортировки мутантных и нормальных наследственных цитоплазматических детерминант или несущих их органелл. Ядерные гены, расположенные в хромосомах, передаются в митозах потомству всех клеток в равной мере, и все клетки организма обладают равными наследственными потенциями по этим генам. Цитоплазматические же гены по причине множественности копий, в которых они представлены, и отсутствия механизма, аналогичного митозу, для точного удвоения и распределения нормальных и мутантных органелл могут распределяться между дочерними клетками асимметрично. Вследствие этого различные части растений могут быть гетерогенными по цитоплазматическим генам и содержать два их типа (нормальный и мутантный) в разных пропорциях.

В результате электронно-микроскопического анализа листьев пестролистных растений различных линий *var* на границе между зеленой и мутантной тканями были обнаружены гетеропластидные клетки (Усатов и др. 2004).

Таким образом, на основании приведенных результатов (постоянное соматическое расщепление, однородительское материнское наследование мутантного признака, изменения внутренней структуры пластид, наличие на границе между нормальными и мутантными тканями гетеропластидных клеток) нами сделан вывод о пластидной природе мутаций у внеядерных пестролистных форм подсолнечника.

В заключении следует отметить, что в результате многолетних наблюдений нами были проанализированы сотни линий внеядерных пестролистных химер подсолнечника, но ни в одной из них не произошло полной рассортировки мутантных и нормальных (зеленых) пластид. Более того, анализ временной динамики возникновения мутантных растений в потомстве пестролистных форм (табл. 2), позволяет заключить, что расщепление пестролистных химер носит устойчивый, регулярно повторяющийся (для 15 линий *var*, на протяжении более 45 лет) характер, демонстрируя генетическую непрерывность пластид в ряду клеточных поколений. Следовательно, после однократной обработки семени мутагеном (НММ), мутантные пластиды, сохраняя свою индивидуальность, при прохождении через тысячи делений в соматических клетках и цитоплазматический мейотический отбор, воспроизводятся в последующих поколениях. Это свидетельствует о возможности адаптивного пути цитоплазматической эволюции, основанной на поддержании в поколениях гетерогенности генетического материала клеточных органелл.

Исследование выполнено в рамках темы Министерства образования и науки РФ (№ 4.5642.2011) и при финансовой поддержке ФЦП Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 16.740.11.0485).

Каталог хлорофильных мутантов подсолнечника I. Пестролистные формы (*Variegated*)

Мутантная линия, год получения	Условия обработки мутагеном	Генетическая природа мутации, ее фенотипическое выражение
<i>Variegated-1</i> 1967	0,01 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 24 ч при 22 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; посев в поле через 10 суток после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-2</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-1</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-3</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-1</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-4</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-1</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-6</i> 1967	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 24 ч при 22 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; посев в поле через 10 суток после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-7</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-8</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-9</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с белыми и светло-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-10</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с белыми и светло-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-11</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-12</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желто-зелеными обесцвечивающимися секторами на листьях.

<i>Variegated-13</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-14</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными обесцвечивающимися секторами на листьях.
<i>Variegated-15</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-17</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>Variegated-6</i>	Внеядерная хлорофильная химера с белыми и светло-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-20</i> 1971	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 15 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; посев в поле через 14 суток хранения семян при 15 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-23</i> 1971	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 25 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; посев в поле через 14 суток хранения семян при 25 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми и желто-зелеными секторами на листьях.
<i>Variegated-24</i> 1975	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 25 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 9:1; посев в поле через 14 суток хранения семян при 25 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.
<i>Variegated-25</i> 1975	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 25 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 9:1; посев в поле через 14 суток хранения семян при 25 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.
<i>Variegated-27</i> 1975	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 25 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; семечки отмывали от НММ и дополнительно обрабатывали без доступа воздуха 2,4-динитрофенолом 10 ⁻⁵ М в течение	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.

	4 ч.; посев в поле через 14 суток хранения семян при 25 ⁰ С после обработки.	
<i>Variegated-28</i> 1975	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 25 ⁰ С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; семечки отмывали от НММ и дополнительно обрабатывали без доступа воздуха рифампицином, 0,015% в течение 4 ч.; посев в поле через 14 суток хранения семян при 25 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.
<i>Variegated-29</i> 1975	Условия обработки как для линии <i>Variegated-28</i>	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.
<i>Variegated-30</i> 1977	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 15 ⁰ С в аэробных условиях; посев в поле через 14 суток хранения семян при 15 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.
<i>Variegated-32</i> 1977	Условия обработки как для линии <i>Variegated-30</i>	Внеядерная хлорофильная химера с белыми секторами на листьях.
<i>Variegated-33</i> 1977	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 15 ⁰ С в аэробных условиях; посев в поле через 10 суток хранения семян при 15 ⁰ С и 5 суток при 25 ⁰ С после обработки.	Внеядерная хлорофильная химера с желтыми секторами на листьях.
<i>Variegated-35</i> 1978	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 18 ч при 25 ⁰ С в анаэробных условиях; семечки отмывали от НММ и проращивали на воде 6 ч при 25 ⁰ С; посев в поле через 12 суток подсушивания и хранения семян при 25 ⁰ С.	Внеядерная хлорофильная химера с белыми секторами на листьях.

Литература

1. Бейли Н. Статистические методы в биологии. // М.: Мир. – 1973. – 271с.
2. Белецкий Ю. Д. Искусственные мутации хлоропластов у высших растений. // Ростов н/Д: РГУ. – 1989. – 80 с.
3. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. // М.: Высшая школа. – 1975. – 392с.
4. Гуськов Е. П., Маркин Н. В., Усатов А. В., Машкина Е. В. Модификация действия нирозометилмочевины на проростки подсолнечника тепловым шоком // Генетика. – 2001. – Т. 37. – С. 336–343.
5. Давыденко О. Г. Нехромосомные мутации. // Минск: Наука и техника. – 1984. – 164 с.
6. Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. // М.: Мир. – 1964. – 260 с.
7. Усатов А. В., Разорителева Е. К., Машкина Е. В., Улитчева И. И. Спонтанные и индуцированные нитрозометилмочевинной реверсии пластомных хлорофильных мутантов подсолнечника *Helianthus annuus* // Генетика. – 2004. – Т. 40. – С. 248–255.
8. Усатов А. В., Рассадина В. В., Аверина Н. Г. и др. Структурно-функциональные особенности мутантных пластид внеядерных пестролистных форм подсолнечника // Физиология растений. – 2004. – Т. 53.– С. 175–183.
9. Усатов А. В., Таран С Ф., Гуськов Е. П. Зависимость пластидного мутагенеза, индуцированного N-нитрозо-N-метилмочевинной, от возраста прорастающих семян подсолнечника в момент обработки // Генетика. – 1995. – Т. 31. – С. 222–227.
10. Усатов А. В., Федоренко Г. М., Устенко А. А. и др. Нехромосомные мутации подсолнечника. // Ростов н/Д: ЮФУ. – 2010. – 264 с.
11. Хохлов С. С. Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных // Успехи соврем. генетики. М.: Наука. – 1967. – Т. 1. – С. 43–105.