

УДК 575.24

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

### ***II. Внеядерные мутации en:chlorina***

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

Аннотация:

Проведен физиолого-генетический анализ мутантов *en:chlorina* из коллекции хлорофильных мутантов подсолнечника Южного федерального университета. Все анализируемые мутанты с желто-зеленой окраской листьев, растения которых в течение нескольких десятилетий, наследуют хлорофильные дефекты, были получены на генетической основе одной инбредной линии с помощью индуцированного нитрозометилмочевинной мутагенеза. На основании полученных результатов: одnorodительское материнское наследование мутантного признака, сниженное содержание в листьях хлорофиллов, изменения внутренней структуры пластид и хлоропластной ДНК, сделан вывод о пластидной природе хлорофильных мутаций *en:chlorina*.

Ключевые слова: *подсолнечник, внеядерный мутант, хлорофильная мутация, индуцированный мутагенез, ультраструктура, хлоропластная ДНК.*

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

### ***II. Extracellular En:chlorina Mutations***

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

Abstract:

*Chlorina* mutations 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. *Chlorina* mutants are characterized by yellow-green leaves, reduced chlorophyll contents, reduced habitus and seed yield. Chlorophyll deficiency may be caused by some reasons in green plants. However, long-term researches of these mutants showed that they met the classic criteria of plastid inheritance. They are characterized by one-parental maternal inheritance of mutant character, defects of plastid structure and functions, changes of chloroplast DNA structure.

**Keywords:** *sunflower, Extranuclear mutant, Chlorophyll mutation, Induced mutagenesis, Ultrastructure, Chloroplast DNA.*

## **Введение**

В предыдущей работе (Усатов и др., 2013) мы привели результаты физиолого-генетического анализа внеядерных пестролистных химер *variegated* из коллекции хлорофильных мутантов подсолнечника Южного федерального университета. Была подчеркнута уникальность коллекционных форм, которая заключается в том, что все хлорофильные мутанты, с различной степенью выраженности хлорофильных дефектов в течение нескольких десятилетий, получены с помощью N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) на генетической основе одной инбредной линии. Данное сообщение посвящено изучению генетической природы индуцированных N-нитрозо-N-метилмочевинной мутаций *chlorina* у коллекционных линий подсолнечника.

## **Материалы и методы**

Объектом исследований служили внеядерные мутанты коллекционных линий *chlorina*, список которых приведен в конце статьи. Мутантные формы 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 в тканях листьев подсолнечника 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

Несмотря на сходство в окраске листьев хлорофильные мутанты *chlorina* являются неоднородной группой. Некоторые мутантные линии сохраняют желто-зеленую окраску в течение всего периода вегетации. Растения других линий зеленеют к началу цветения, почти не отличаясь в это время по окраске от зеленых растений исходной линии 3629. У некоторых мутантов *chlorina* проявление мутантного признака наблюдается на более поздней, чем первая пара листьев, фазе развития (Белецкий, 1989). Внешний вид растения линии 3629 и мутанта *en:chlorina-5* приведены на рисунках 1, 2.

Рисунок 1 — Растение инбредной линии 3629



Рисунок 2 — Внеядерный хлорофильный мутант *en:chlorina-5*



В таблице 1 суммированы результаты реципрокных скрещиваний 7 линий *chlorina* с зелеными растениями, свидетельствующие о строго внеядерном характере наследования данных мутаций. Когда в скрещиваниях с мутантами материнским растением является исходная линия 3629, в  $F_1$  всегда возникают только зеленые растения. При реципрокных скрещиваниях в  $F_1$  представлен исключительно мутантный фенотип. В последующих поколениях  $F_2$ ,  $F_3$  ни зеленые, ни мутантные формы не расщепляются.

Таблица 1 — Реципрокные скрещивания мутантов *en:chlorina* с зелеными растениями исходной линии 3629

Вид скрещивания	Фенотип растений $F_1$		Фенотип растений $F_2$	
		зеленые	<i>chlorina</i>	зеленые

<i>en:chlorina-1</i> x 3629	0	51	0	568
3629 x <i>en:chlorina-1</i>	42	0	996	0
<i>en:chlorina-2</i> x 3629	0	41	0	373
3629 x <i>en:chlorina-2</i>	37	0	583	0
<i>en:chlorina-3</i> x 3629	0	59	0	601
3629 x <i>en:chlorina-3</i>	54	0	861	0
<i>en:chlorina-5</i> x 3629	0	33	0	395
3629 x <i>en:chlorina-5</i>	57	0	712	0
<i>en:chlorina-6</i> x 3629	0	31	0	443
3629 x <i>en:chlorina-6</i>	52	0	691	0
<i>en:chlorina-7</i> x 3629	0	44	0	412
3629 x <i>en:chlorina-7</i>	41	0	786	0
<i>en:chlorina-8</i> x 3629	0	56	0	312
3629 x <i>en:chlorina-8</i>	35	0	403	0
<i>en:chlorina-14</i> x 3629	0	59	0	452
3629 x <i>en:chlorina-14</i>	47	0	603	0

Однако не все мутанты *en:chlorina* проявляют «классические» различия при реципрокных скрещиваниях. Об этом свидетельствуют данные, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 — Расщепление гибридов от скрещивания мутантов *en:chlorina* с зелеными растениями исходной линии 3629

Вид скрещивания	Количество растений $F_1$		
	зеленые	<i>chlorina</i>	<i>xantha</i>
<i>en:chlorina-4</i> x 3629	7	15	0

3629 x <i>en:chlorina-4</i>	33	0	0
<i>en:chlorina-9</i> x 3629	62	21	0
3629 x <i>en:chlorina-9</i>	99	0	0
<i>en:chlorina-10</i> x 3629	46	76	34
3629 x <i>en:chlorina-10</i>	83	0	0
<i>en:chlorina-11</i> x 3629	38	12	0
3629 x <i>en:chlorina-11</i>	44	0	0
<i>en:chlorina-12</i> x 3629	51	39	0
<i>en:3629</i> x <i>chlorina-12</i>	46	0	0

У мутантов *chlorina-4*; *chlorina-9*; *chlorina-12* в потомстве зеленых растений в  $F_2$ , после прямых скрещиваний (*chlorina* x 3629), наблюдается расщепление, сходное с таковым при гибридизации. У мутанта *chlorina-10* часть потомства зеленых растений  $F_1$  (2 из 5 исследованных) остается константным, остальные расщепляются примерно так же как и при гибридизации — 41 зеленых : 59 *chlorina* : 31 *xantha* (летали). У мутанта *chlorina-11* в потомстве зеленых растений  $F_2$  наблюдается расщепление — 206 зеленых : 56 *chlorina*, а в потомстве зеленых растений  $F_3$  — 103 зеленых : 30 *chlorina*. Интересно, что после обратных скрещиваний растений линии 3629 с этими мутантами (3629 x *chlorina*) потомство гибридов  $F_1$ , в последующих поколениях остается константными. На основании полученных результатов данные линии, были отнесены к мутантам, имеющим сложный тип наследования хлорофильного дефекта, обусловленный взаимодействием ядра и цитоплазмы.

Мутанты *chlorina* различаются между собой, и в первую очередь, отличаются от зелёных растений количеством зелёных пигментов, габитусом и продуктивностью. В таблице 3 приведены морфофизиологические показатели, а также содержание хлорофиллов в листьях растений *chlorina*. Видно, что все рассматриваемые мутанты это относительно низкорослые, малопродуктивные и мелкосемянные формы с пониженным содержанием хлорофиллов (54,6 %—91,6 %) по сравнению с зелеными растениями 3629.

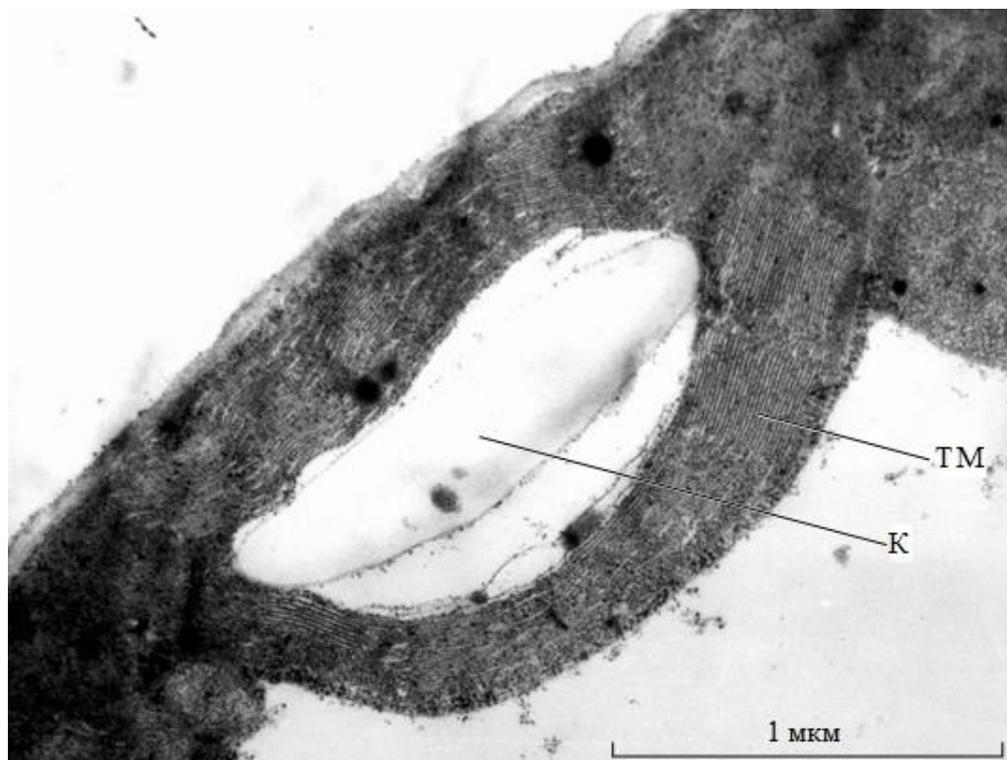
Таблица 3 — Морфофизиологическая характеристика внеядерных мутантов *chlorina* подсолнечника

Линия	Высота, см	Диаметр корзины, см	Продуктивность одного растения, г	Вес 1000 семян, г	Кол-во хлорофилл. а+в, мг/г сух. веса
3629	145,5±1,5	10,9±0,3	34,6±1,6	42,7±1,4	7,52±0,17
<i>en:chlorina-1</i>	102,4±1,7	6,9±0,5	21,0±1,2	24,7±1,8	6,13±0,23
<i>en:chlorina-2</i>	117,9±1,6	7,7±0,4	26,2±2,7	37,4±2,1	6,02±0,33
<i>en:chlorina-3</i>	99,0±2,2	6,1±0,3	14,5±1,9	21,2±2,4	6,19±0,31
<i>en:chlorina-4</i>	112,3±3,6	7,6±0,6	19,7±1,4	29,9±3,0	4,86±0,18
<i>en:chlorina-5</i>	115,9±2,1	8,7±0,4	23,3±3,1	26,1±1,5	5,51±0,11
<i>en:chlorina-6</i>	97,7±1,9	7,2±0,4	20,5±1,5	35,2±0,9	6,91±0,31
<i>en:chlorina-7</i>	110,3±1,5	7,1±0,4	21,5±1,2	30,7±1,2	5,78±0,16
<i>en:chlorina-8</i>	82,4±2,2	4,7±0,6	10,3±2,2	17,2±2,6	5,75±0,56
<i>en:chlorina-9</i>	90,6±2,0	5,1±0,5	12,7±3,1	22,4±2,3	5,51±0,25
<i>en:chlorina-10</i>	109,9±2,4	7,8±0,5	23,7±1,8	33,2±1,5	4,51±0,38
<i>en:chlorina-11</i>	105,1±2,9	7,4±0,3	18,6±2,4	30,7±1,9	4,11±0,37
<i>en:chlorina-12</i>	131,7±2,3	8,1±0,3	25,7±3,2	38,0±2,1	5,44±0,36

Для пестролистных химер подсолнечника было показано, что между количеством хлорофиллов и степенью сформированности внутренней структуры хлоропластов имеется высокая корреляция (Усатов и др., 2004). Эта закономерность наблюдается и у мутантов *chlorina*. Так, наименьшее количество хлорофиллов содержат растения *en:chlorina-11* (табл. 3). Ультраструктурная организация пластид у данного мутанта также имеет наибольшие отклонения от нормы среди других линий *chlorina* (Усатов и др. 2010).

В норме хлоропласты подсолнечника инцухт-линии 3629 имеют ультраструктуру, характерную для хлоропластов многих высших растений (рис. 3).

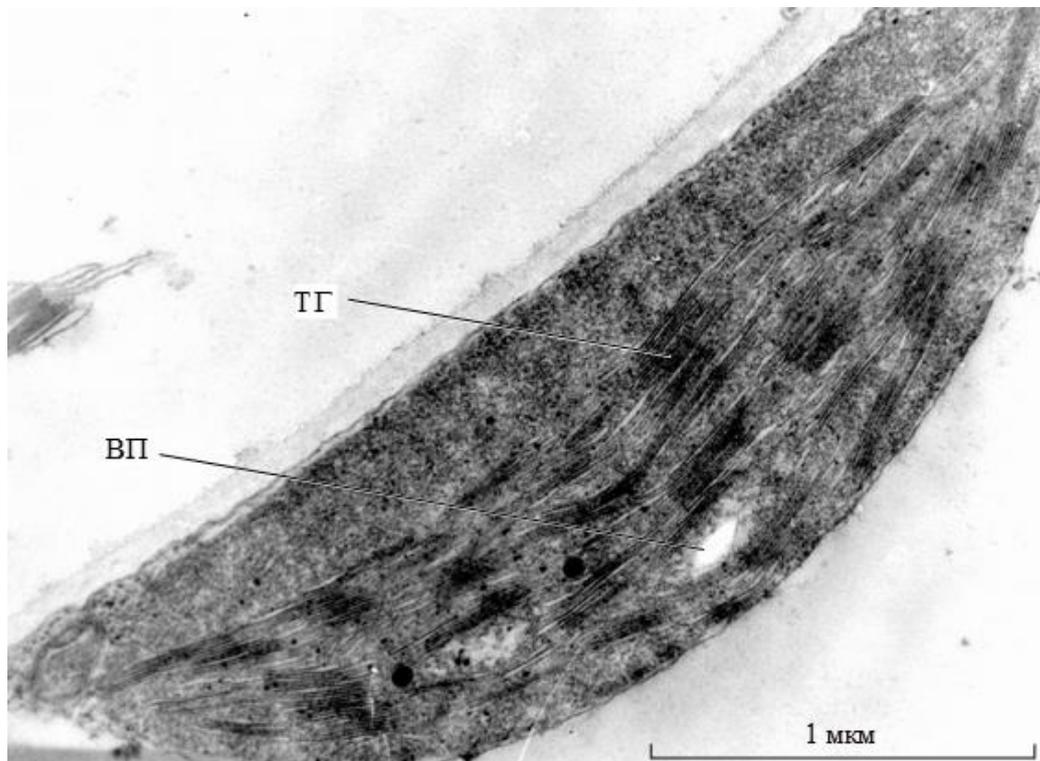
Рисунок 3 — Ультраструктура хлоропластов на срезах листьев подсолнечника инбредной линии 3629



Овальные или линзообразные хлоропласты окружены хорошо выраженной двойной мембраной и имеют развитую ламеллярную систему, представленную ламеллами гран и ламеллами стромы. Тилакоидная система занимает всё внутреннее пространство хлоропласта, что свидетельствует о высокой функциональной активности органеллы. В довольно плотном мелкозернистом матриксе хлоропластов можно наблюдать электронно-прозрачные участки, в которых видны рибосомоподобные частицы. На срезах хлоропластов подсолнечника, как правило, в центре локализованы крупные зерна крахмала. Осмиофильные глобулы немногочисленны.

Структурная организация пластид у мутантов *chlorina* имеет ряд общих различий по сравнению со структурой хлоропластов растений исходной линии 3629 (рис. 4).

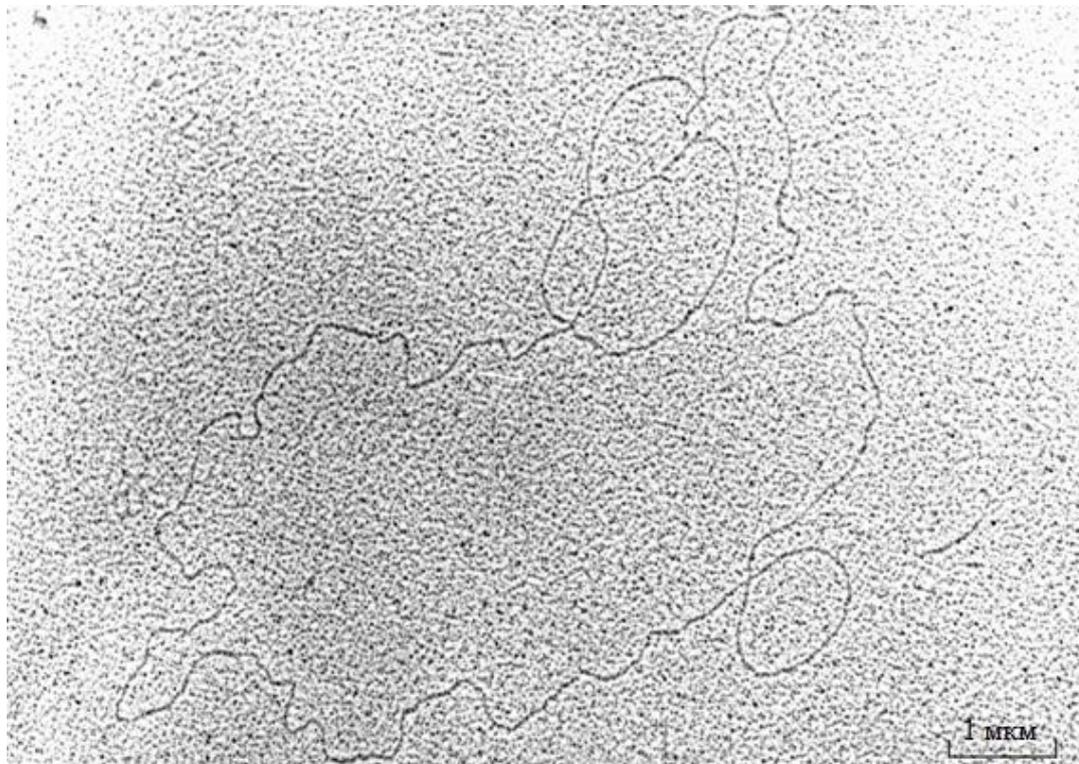
Рисунок 4 — Ультраструктура пластид на срезах листьев подсолнечника мутанта *chlorina-11*



К таким различиям относятся набухание отдельных тилакоидов, вакуолизация некоторых ламелл, менее развитая структура тилакоидов гран и стромы, сниженное количество крахмальных зёрен.

Методом электронного микрофотографирования был проведен сравнительный анализ формы и размеров хлДНК линии 3629 и мутантов *en:chlorina-5* и *en:chlorina-12* (Усатов и др., 2010). Показано, что хлДНК у 3-х исследуемых линий кольцевой формы и находятся в сверхспирализованном и релаксированном состояниях (рис. 5), с контурной длиной  $49,2 \pm 0,9$  мкм;  $50,6 \pm 1,2$  мкм и  $49,7 \pm 0,6$  мкм, соответственно.

Рисунок 5 — Электронная микрофотография кольцевой молекулы хлДНК подсолнечника (инбредная линия 3629)



Следовательно, форма и размер хлДНК двух мутантов *en:chlorina* на уровне разрешения электронного микрофотографирования оказались сходными как между собой, так и по сравнению с контрольной линией.

Для выявления изменений в последовательности нуклеотидов ДНК органелл у мутантов *en:chlorina* в лаборатории чл.-корр. НАН Беларуси О. Г. Давыденко (Институт генетики и цитологии, НАН Беларуси) был проведен сравнительный электрофоретический анализ рестрицированной эндонуклеазами пластидной и митохондриальной ДНК, позволяющий проводить исследования на уровне фрагментов (Трибуш, 1999; Triboush et al., 1999).

Сравнительный электрофоретический анализ, рестрицированной 13-ю эндонуклеазными ферментами (BamH I, Bgl II, Bgl III, Bsp 681, EcoR I, Hind III, Hpa I, Pst I, Sac I, Sal I, Sma I, Xba I, Xho I) хлДНК мутантных линий *en:chlorina* и исходной родительской формы 3629, выявил полиморфизм хлДНК только у одного фермента — Hind III. В электрофоретическом

спектре хпДНК у линии *en:chlorina-6* исчез фрагмент размером 8,9 т.п.н. и появились два дополнительных, более легких фрагмента — 5,2 т.п.н. и 3,7 т.п.н. Сумма размеров вновь появившихся была приблизительно равна размеру исчезнувшего — 8,9 т.п.н. Это означает, что в 8,9 т.п.н./HindIII-фрагменте хпДНК линии *en:chlorina-6*, возникла мутация, в результате которой появился новый сайт узнавания (A↓AGCTT) для эндонуклеазы Hind III.

Новый сайт для фермента Hind III был обнаружен в рестрикционных спектрах хпДНК еще двух мутантов: *en:chlorina-2* и *en:chlorina-7*. В хпДНК этих линий возник аналогичный тип перестройки нуклеотидной последовательности: исчез один фрагмент размером 6,7 т.п.н. и появились два дополнительных более легких фрагмента 3,2 т.п.н. и 3,5 т.п.н. Сравнение суммарного размера вновь возникших фрагментов с исчезнувшим, позволяет предположить возникновение мутантного сайта для эндонуклеазы Hind III в нуклеотидной последовательности фрагмента размером 6,7 т.п.н.

Изменений в последовательности нуклеотидов митохондриальной ДНК у мутантов *en:chlorina* не обнаружено. Однако полностью исключить наличие точечных мутаций в мтДНК у исследованных мутантных линий нельзя, так как они могут лежать за пределами разрешающей способности использованного метода.

Таким образом, приведенные результаты убедительно подтверждают пластомную природу мутаций *en:chlorina* у внеядерных мутантов подсолнечника. Следует подчеркнуть, что сходный фенотипический эффект — желто-зеленая окраска листьев — вызывают мутации, локализованные в разных местах хлоропластного генома (Даниленко, Давыденко, 2003). Дальнейший сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей геномов клеточных органелл (пластид и митохондрий) позволит нам локализовать мутации и в других линиях *en:chlorina*.

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. II. Мутанты *en:chlorina***

<b>Мутантная линия, год получения</b>	<b>Условия обработки мутагеном</b>	<b>Генетическая природа мутации, ее фенотипическое выражение</b>
<i>En:chlorina-1</i> 1967	0,01 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 24 ч при 22 <sup>0</sup> С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; посев в поле через 10 суток после обработки.	Внеядерный хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-2</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-1</i>	Внеядерный хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-3</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-1</i>	Внеядерный, устойчивый к сульфатному засолению хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-4</i> 1967	0,02 % раствор НММ (рН 7,0); обработка 24 ч при 22 <sup>0</sup> С; соотношение объемов раствора НММ и семян 2:1; посев в поле через 10 суток после обработки.	Хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона.
<i>En:chlorina-5</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-4</i>	Внеядерный, засухоустойчивый хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-6</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-4</i>	Внеядерный, устойчивый к хлоридному засолению хлорофильный

		мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-7</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-4</i>	Внеядерный хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-8</i> 1967	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-4</i>	Внеядерный хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-9</i> 1981	Выделен из М <sub>3</sub> поколения химеры <i>Variegated-33</i>	Хлорофильный мутант сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-10</i> 1987	Семянки замачивали в воде без доступа воздуха 24 ч при 2 <sup>0</sup> С, затем проращивали при 25 <sup>0</sup> С 12 ч на воде и 6 ч на 0,015% растворе НММ; посев в поле через 14 суток после окончания обработки мутагеном.	Хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона.
<i>En:chlorina-11</i> 1989	Семянки замачивали в воде без доступа воздуха 18 ч при 18 <sup>0</sup> С, затем обрабатывали 3 ч 0,001% НММ при 25 <sup>0</sup> С и проращивали 6 ч при 25 <sup>0</sup> С на 0,015% растворе НММ; посев в поле через 14 суток после окончания обработки мутагеном.	Хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона.
<i>En:chlorina-12</i> 1985	Семянки замачивали в воде без доступа воздуха 24 ч при 18 <sup>0</sup> С, затем проращивали при 25 <sup>0</sup> С 6 ч на 0,01% растворе НММ и 0,3% рифампицина; посев в поле через 12 суток после окончания обработки	Хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона.

	мутагеном.	
<i>En:chlorina-13</i> 2000	Семянки замачивали в воде без доступа воздуха 20 ч при 18°C, затем последовательно проращивали на воде 1 ч при 40°C, 11 ч при 25°C, 3 ч в 0,015% растворе НММ при 25°C; посев в поле через 12 ч после окончания обработки мутагеном.	Хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона.
<i>En:chlorina-14</i> 2000	Семянки замачивали в воде без доступа воздуха 20 ч при 18°C, затем последовательно проращивали на воде 11 ч при 25°C, 1 ч при 40°C, 3 ч в 0,015% растворе НММ при 25°C; посев в поле через 12 ч после окончания обработки мутагеном.	Внеядерный хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев.
<i>En:chlorina-15</i> 2000	Условия обработки НММ как для линии <i>En:chlorina-14</i>	Хлорофильный мутант с желто-зеленой окраской листьев сложной генетической природы, обусловленной взаимодействием ядра и цитоплазмона.

## 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. Даниленко Н. Г., Давыденко О. Г. Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогія. – 2003. – 494с.
5. Трибуш С. О. Изменения геномов органелл пластомных мутантов типа *chlorina* у подсолнечника (*Helianthus annuus*): Автореф. дис....канд. биол. наук. Минск: Институт генетики и цитологии, 1999. 20 с.
6. Усатов А. В., Колоколова Н. С., Рожкова О. К. и др. Хлорофильные мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозо-N-метилмочевинной и особенности их наследования. I. Пестролистный химеры // «Живые и биокосные системы». – 2012. – №1; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-1/article-8> (12.08.2013)
7. 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.
8. Усатов А. В., Федоренко Г. М., Устенко А. А. и др. Нехромосомные мутации подсолнечника. Ростов н/Д: ЮФУ. – 2010. – 264 с.
9. Triboush S. O., Danilenko N. G., Ulitcheva I. I., Davydenko O. G. Location of induced mutations and reversions in the chloroplast genome of *Helianthus annuus* // Plant Growth Regulation. - 1999. - Vol. 27. - P. 75-81.