

УДК 575.133

Молекулярно-генетические и физиологические особенности хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника с внеядерным типом наследования

Макаренко Максим Станиславович, Ковалевич Алексей Александрович, Шамова Татьяна Владимировна, Казанцев Михаил Юрьевич, Усатов Александр Вячеславович

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация: Растения с хлорофильными мутациями являются классическим объектом для изучения как механизмов биогенеза фотосинтетического аппарата, так и ядерно-цитоплазматических взаимоотношений. Проведен физиолого-генетический анализ линий *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6* и *en:chlorina-7* из коллекции хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) Южного федерального университета. Все анализируемые мутанты с желто-зеленой окраской листьев были получены на генетической основе одной инбредной линии 3629 с помощью индуцированного нитрозометилмочевинной мутагенеза и имеют внеядерный тип наследования мутаций. Сравнительный анализ локализованных в хлоропластной ДНК мутаций и фотохимической активности изучаемых линий позволяют предположить, что мутантный фенотип *en:chlorina-1* непосредственно связан с несинонимичной мутацией в гене *psaB* (Thr586Ile), *en:chlorina-6* – в гене *psaB* (Gly385Glu), а *en:chlorina-7* – в генах *psaA* (Thr528Ile) и *psbB* (His157Tyr).

Ключевые слова: хлорофильные мутанты, хлоропластная ДНК, фотохимическая активность, ядерно-цитоплазматическое взаимодействие, подсолнечник

Molecular-genetic and physiological features of chlorophyll-deficient sunflower mutants with extra-nuclear inheritance type

Makarenko Maksim Stanislavovich, Kovalevich Aleksey Aleksandrovich, Shamova Tat'yana Vladimirovna, Kazancev Mikhail Yur'evich, Usatov Aleksandr Vyacheslavovich

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract: Chlorophyll-deficient mutants are the appropriate models for providing investigations both of photosynthetic apparatus and nuclear-cytoplasmic relationships. In the current research, the genetic and physiological analysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant lines (*en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*, *en:chlorina-7*) was conducted. All the analyzed mutant lines have a yellow-green phenotype with an extra-nuclear type of mutation inheritance and have been

Макаренко М. С., Ковалевич А. А., Шамова Т. В., Казанцев М. Ю., Усатов А. В., Молекулярно-генетические и физиологические особенности хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника с внеядерным типом наследования // «Живые и биокосные системы». – 2019. – № 27; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-27/article-4>

obtained on the genetic basis of single inbred line 3629 by N-nitrosomethylurea induced mutagenesis. Matching the data of photochemical activity with chloroplast DNA genotyping data revealed that *en:chlorina-1* mutant phenotype is associated with a non-synonymous mutation in the *psaB* (Thr586Ile) gene, *en:chlorina-6* – in the *psaB* (Gly385Glu), and *en: chlorina -7* – in *psaA* (Thr528Ile) and *psbB* (His157Tyr) genes.

Keywords: chlorophyll-deficient mutants, chloroplast DNA, photochemical activity, nuclear-cytoplasmic relationships, sunflower.

Введение

Доминирующая роль ядра в растительной клетке неопровержимо доказана многочисленными генетическими исследованиями. Однако в пластидах и митохондриях растительных клеток локализованы еще и собственные генетические системы [10]. Эти системы функционируют различно, но взаимосвязано. Примером взаимодействия нескольких генетических систем у растений является процесс фотосинтеза, в котором участвуют белки, кодируемые как ядерной, так и хлоропластной ДНК (хлДНК) [3]. В связи с этим хлорофильные мутанты являются удобной генетической моделью для изучения механизмов биогенеза фотосинтетического аппарата и ядерно-пластидных взаимодействий. Большинство такого рода исследований проводят на жизнеспособных мутантах типа *chlorina* с желто-зеленой окраской листьев [2, 4, 9]. Хлорофильные мутации представлены двумя типами – ядерные и пластомные (внеядерные). Подавляющее число работ посвящено хлорофильным мутациям ядерного типа, в то время как пластомные мутации менее изучены [5, 7]. В предыдущей работе [1] мы привели результаты морфофизиологического, гибридизационного и ультраструктурного анализов внеядерных мутантов типа *chlorina*. Целью данного исследования является сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей хлоропластной ДНК и особенностей фотохимической активности фотосистем I (ФС I) и II (ФС II) у хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника с внеядерным типом наследования.

Материал и методы исследования

Объектами исследования служили растения подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) линии 3629 и мутантных линий *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*, *en:chlorina-7*. Все анализируемые мутанты с желто-зеленой окраской листьев были получены на генетической основе одной инбредной линии 3629 с помощью индуцированного нитрозометилмочевинной мутагенеза [11] и имеют внеядерный тип наследования мутаций [1]. Мутантные линии характеризуются сниженным содержанием хлорофиллов (a+b) приблизительно на 30 % по сравнению с исходной линией 3629 [1].

Выделение ДНК из гомогенатов листьев подсолнечника проводили с помощью коммерческого набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Россия). Библиотеки для высокопроизводительного секвенирования были приготовлены с использованием набора реактивов Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, США). Определение полных последовательностей геномов осуществлялось методом высокопроизводительного параллельного секвенирования с применением прибора MiSeq (Illumina, США) и набора реактивов MiSeq Reagent Kit v2 500-cycles (Illumina, США). Качество полученных ридов оценивали с помощью программы FastQC. Используя программу Trimmomatic проводили тримминг ридов, содержащих адаптерную последовательность или имеющих качество прочтения (Q-score) ниже 25. На основе полученных парных ридов проводили *de novo* сборку (ассемблер SPAdes v 3.10.1) хлоропластных геномов и путем их выравнивания (BLAST) относительно хлДНК линии 3629 осуществляли поиск полиморфных сайтов в хлДНК мутантных линий.

Параметры, характеризующие фотохимическую активность ФС I и ФС II, рассчитывали с использованием метода индукции флуоресценции Хл для листьев подсолнечника, адаптированных в течение 30 минут к темноте. К ним относились: показатель эффективности функционирования электронтранспортной цепи (ETR), константы фотохимического (qP) и нефотохимического тушения (qN, NPQ) флуоресценции, максимальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II (Fv/Fm), эффективные квантовые выходы фотохимических реакций ФС I и ФС II (Y(I) и Y(II)), квантовый выход регулируемой (Y (NPQ)) и нерегулируемой (Y (NO)) диссипации энергии в ФС II, а также квантовые выходы фотохимических реакций ФС I, характеризующие донорные (Y (ND)) и акцепторные (Y (NA)) свойства P700. Определение параметров индукции флуоресценции Хл проводили на РАМ-флуориметре «DUAL-PAM 100» (HeinzWalz, Германия) с модулем регистрации флуоресценции P700 согласно Kramer et al. [8]. Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные из трех независимых опытов. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p = 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического анализа хлоропластных геномов у хлорофилл-дефицитных линий подсолнечника всего выявлено 14 полиморфных сайтов: два в хлДНК линии *en:chlorina-1*, пять – в *en:chlorina-6* и семь – в *en:chlorina-7* (таблица 1).

Таблица 1 – Локализация мутаций в хлоропластных геномах линий *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*, *en:chlorina-7*

Позиция в хлоропластном геноме 3629	Линия 3629	<i>en:chl-1</i>	<i>en:chl-6</i>	<i>en:chl-7</i>	Локализация мутации	Тип мутации
13467	C	C	C	T	<i>rpoB</i>	Несинонимичная Ser138Leu
37493	G	A	G	G	<i>psaB</i>	Несинонимичная Thr586Ile
38096	C	C	T	C	<i>psaB</i>	Несинонимичная Gly385Glu
39945	G	G	G	A	<i>psaA</i>	Несинонимичная Thr528Ile
69191	C	C	C	T	МГР* <i>rps12-clpP</i>	
72247	C	C	C	T	<i>psbB</i>	Несинонимичная His157Tyr
74767	G	G	A	G	интрон <i>petB</i>	
77386	G	G	G	A	<i>rpoA</i>	Синонимичная
78641	C	C	C	T	<i>rps11</i>	Синонимичная
82325	G	G	A	G	<i>rps3</i>	Синонимичная
110809	G	G	G	A	<i>ycf1</i>	Синонимичная
115094	C	C	T	C	<i>ndhA</i>	Несинонимичная Ala141Val
116823	C	C	T	C	<i>ndhA</i>	Несинонимичная Thr356Ile
119680	C	T	C	C	<i>ndhD</i>	Синонимичная

*МГР – межгенный регион

Две мутации из четырнадцати были выявлены в некодирующих областях хлДНК: SNP в позиции 72247 хлДНК линии *en:chlorina-7* локализован между генами *rps12* и *clpP*, SNP в позиции 74767 хлДНК линии *en:chlorina-6* – в интроне гена *petB*. Двенадцать SNP было обнаружено в кодирующих последовательностях хлДНК. Мутации в генах *rpoA*, *rps11*, *ycf1*, *rps3*, *ndhD* оказались синонимичными, в то время как мутации в генах *rpoB* (Ser138Leu), *psaA* (Thr528Ile), *psbB* (His157Tyr), *psaB* (Thr586Ile и Gly385Glu), *ndhA* (Ala141Val), *ndhA* (Thr356Ile) приводят к замене аминокислот транслируемых белков.

Хлоропластные гены весьма консервативны [6], поэтому мы предположили, что мутантный фенотип исследуемых линий подсолнечника

связан с несинонимичными мутациями. Мы провели поиск в базе данных NCBI нуклеотидных последовательностей, гомологичных мутантным аллельным вариантам генов, и установили, что SNP в генах *rpoB* (Ser138Leu) и *ndhA* (Ala141Val, Thr356Ile) являются распространенными полиморфными сайтами в хлДНК растений с нормальным фенотипом. Следовательно, эти замены, скорее всего, не связаны с мутантным, желто-зеленым, фенотипом у растений подсолнечника. Гораздо больший интерес представляют мутации в генах *psaA*, *psaB* и *psbB*, кодирующих белки, входящие в состав реакционных центров ФС I (*psaA*, *psaB*) и ФС II (*psbB*). Эти белки являются необходимыми компонентами для функционирования фотосистем, и изменения в их структуре могут влиять на активность фотосистем и содержание хлорофиллов.

Показатели фотохимической активности ФС I и ФС II хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительные значения параметров, характеризующих активность ФС I и II, линий 3629, *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*, *en:chlorina-7*

Параметры	Линия 3629	<i>en:chlorina-1</i>	<i>en:chlorina-6</i>	<i>en:chlorina-7</i>
Fo	0,98±0.07	1,66±0.04	1,45±0.14	1,18±0,01
Fm	4,33±0.25	5,35±0.14	5,12±0.14	3,81±0,14
Fv/Fm	0,77±0.03	0,69±0.01	0,72±0.04	0,72±0,00
Y(II)	0,64±0.05	0,41±0.02	0,42±0.05	0,64±0,02
ETR(II)	35,13±2.83	22,75±0.90	23,10±2.97	32,33±1,13
qP	0,87±0.03	0,69±0.01	0,68±0.03	0,87±0,02
qN	0,22±0.03	0,43±0.02	0,46±0.04	0,20±0,00
NPQ	0,23±0.04	0,52±0.03	0,59±0.07	0,20±0,00
Y(NPQ)	0,07±0.02	0,20±0.01	0,22±0.04	0,08±0,00
Y(NO)	0,29±0.04	0,39±0.01	0,36±0.02	0,27±0,01
Pm	1,76±0.11	1,16±0.13	1,48±0.02	1,13±0,15
Y(I)	0,77±0.08	0,80±0.02	0,76±0.01	0,86±0,00
ETR(I)	42,20±4.50	43,98±1.11	41,55±0.35	47,17±0,21
Y(ND)	0,15±0.06	0,13±0.02	0,12±0.04	0,22±0,01
Y(NA)	0,08±0.04	0,07±0.01	0,12±0.05	0,04±0,00

Среди исследуемых нами параметров фотохимической активности ФС I, прежде всего, следует отметить значительное снижение максимального уровня флуоресценции (Pm): на 35 % у *en:chlorina-1* и *en:chlorina-7* и на 15 % у *en:chlorina-6*. Изменение такого параметра, как Pm, свидетельствует о редукции комплексов ФС I и предположительно связано с мутациями в генах *psaA* (у *en:chlorina-7*) и *psaB* (у *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*). Значения квантового выхода (Y(I)) и эффективности транспорта электронов (ETR(I)) ФС I у мутантов *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6* не отличались от линии 3629, а у растений *en:chlorina-7* – были на 10 % выше.

Также были зарегистрированы достоверные изменения параметров фотохимической активности ФС II. У мутанта *en:chlorina-7* отмечены снижение на 7—10 % нескольких показателей активности ФС II, а именно: максимального уровня флуоресценции (Fm), максимального квантового выхода фотохимических реакций (Fv/Fm), эффективного квантового выхода (Y(II)) и эффективности транспорта электронов (ETR(II)). Данные изменения могут быть ассоциированы с мутацией в гене *psbB*. Значительное снижение (на 35 %) Y(II) и ETR(II) также обнаружено у мутантов *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*. Интересно, что по сравнению с линией 3629 у *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6* в два раза увеличено значения нефотохимического тушения флуоресценции (qN), при этом регулируемая диссипация (Y(NPQ)) увеличена в три раза, а нерегулируемая диссипация (Y(NO)) – в 1,3 раза. Подобных изменений не выявлено у мутанта *en:chlorina-7*.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов исходной линии 3629 и мутантных хлорофилл-дефицитных линий *en:chlorina-1*, *en:chlorina-6*, *en:chlorina-7* с внеядерным типом наследования было обнаружено 14 SNP, 12 из которых были локализованы в генах, а остальные 2 – в некодирующих последовательностях ДНК. При этом 7 мутаций, локализованных в генах *rpoB*, *psaA*, *psbB*, *psaB*, *ndhA*, являются несинонимичными. Также были получены данные, позволяющие оценить фотохимическую активность фотосистем I и II. Сравнительный анализ локализованных в хлоропластной ДНК мутаций и фотохимической активности позволяет предположить, что мутантный фенотип *en:chlorina-1* непосредственно связан с несинонимичной мутацией в гене *psaB* (Thr586Ile), *en:chlorina-6* – в гене *psaB* (Gly385Glu), а *en:chlorina-7* – в генах *psaA* (Thr528Ile) и *psbB* (His157Tyr).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00659.

Список литературы

1. Усатов А. В., Колоколова Н. С., Усатова О. А., Рожкова О. К., Чеснокова Н. А., Федорова М. А., Усатов Н. А., Плотников В. Г. Хлорофильные мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозо-N-метилмочевинной и особенности их наследования II. Внеядерные мутации *en:chlorina* // «Живые и биокосные системы», 2013. № 3; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-3/article-20>
2. Ansari M. J., Al-Ghamdi A., Kumar R. et al. Characterization and gene mapping of a chlorophyll-deficient mutant *clm1* of *Triticum monococcum* L. // *Biologia plantarum*, 2013. Vol. 57. – Pp. 442—448.

3. Bock R. Cell and Molecular Biology of Plastids // Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2007. – 534 p.
4. Brestic M., Zivcak M., Kunderlikova K. et al. Low PSI content limits the photoprotection of PSI and PSII in early growth stages of chlorophyll b-deficient wheat mutant lines // Photosynthesis research, 2015. Vol. 125. – Pp. 151—166.
5. Colombo N., Emanuel C., Lainez V. et al. The barley plastome mutant CL2 affects expression of nuclear and chloroplast housekeeping genes in a cell-age dependent manner // Molecular Genetics and Genomics, 2008. Vol. 279. – Pp. 403—414.
6. Drouin G., Daoud H., Xia J. Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants // Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008. Vol. 49. № 3. – Pp. 827—831.
7. Hirao T., Watanabe A., Kurita M. et al. A frameshift mutation of the chloroplast matK coding region is associated with chlorophyll deficiency in the *Cryptomeria japonica* virescent mutant Wogon-Sugi // Current genetics, 2009. Vol. 55. – Pp. 311—321.
8. Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E., 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes // Photosynthesis Res., 2004. Vol. 79. – Pp. 209—218.
9. Li N., Jia J., Xia C. et al. Characterization and mapping of novel chlorophyll deficient mutant genes in durum wheat // Breeding Science, 2013. Vol. 63. – Pp. 169—175.
10. Stanley L., Forrester N. J., Govindarajulu R., Liston A., Ashman T. L. Geographic patterns of genetic variation in three genomes of North American diploid strawberries with special reference to *Fragaria vesca* subsp. *Bracteata* // Botany, 2015. Vol. 93. № 9. – Pp. 573—588.
11. Usatov A.V., Razoriteleva E. K., Mashkina E. V., Ulitcheva I. I. Spontaneous and Nitrosomethylurea-Induced Reversions in Plastome Chlorophyll Mutants of Sunflower *Helianthus annuus* L. // Russian Journal of Genetics, 2004. Vol.40. №2. – Pp. 186—192.

Spisok literatury

1. Usatov A. V., Kolokolova N. S., Usatova O. A., Rozhkova O. K., Chesnokova N. A., Fedorova M. A., Usatov N. A., Plotnikov V. G. Xlorofil'nye mutacii podsolnechnika, inducirovannye N-nitrozo-N-metilmochevinoj i osobennosti ix nasledovaniya II. Vneyadernye mutacii en:chlorina // «Zhivye i biokosnye sistemy», 2013. № 3; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-3/article-20>
2. Ansari M. J., Al-Ghamdi A., Kumar R. et al. Characterization and gene mapping of a chlorophyll-deficient mutant *clm1* of *Triticum monococcum* L. // *Biologia plantarum*, 2013. Vol. 57. – pp. 442-448.
3. Bock R. Cell and Molecular Biology of Plastids // Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2007. – 534 p.

Макаренко М. С., Ковалевич А. А., Шамова Т. В., Казанцев М. Ю., Усатов А. В., Молекулярно-генетические и физиологические особенности хлорофилл-дефицитных мутантов подсолнечника с внеядерным типом наследования // «Живые и биокосные системы». – 2019. – № 27; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-27/article-4>

4. Brestic M., Zivcak M., Kunderlikova K. et al. Low PSI content limits the photoprotection of PSI and PSII in early growth stages of chlorophyll b-deficient wheat mutant lines // *Photosynthesis research*, 2015 Vol. 125 – pp. 151–166.
5. Colombo N., Emanuel C., Lainez V. et al. The barley plastome mutant CL2 affects expression of nuclear and chloroplast housekeeping genes in a cell-age dependent manner. // *Molecular Genetics and Genomics*, 2008. Vol. 279. – pp. 403–414.
6. Drouin G., Daoud H., Xia J. Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants // *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008. Vol. 49. № 3. – P. 827—831.
7. Hirao T., Watanabe A., Kurita M. et al. A frameshift mutation of the chloroplast matK coding region is associated with chlorophyll deficiency in the *Cryptomeria japonica* virescent mutant Wogon-Sugi // *Current genetics*, 2009. Vol. 55. – pp. 311–321.
8. Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E., 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes // *Photosynthesis Res.*, 2004. Vol. 79. – pp. 209-218
9. Li N., Jia J., Xia C. et al. Characterization and mapping of novel chlorophyll deficient mutant genes in durum wheat // *Breeding Science*, 2013. Vol. 63. – pp. 169–175.
10. Stanley L., Forrester N. J., Govindarajulu R., Liston A., Ashman T. L. Geographic patterns of genetic variation in three genomes of North American diploid strawberries with special reference to *Fragaria vesca* subsp. *Bracteata* // *Botany*, 2015. Vol. 93. № 9. – pp. 573—588.
11. Usatov A.V., Razoriteleva E. K., Mashkina E. V., Ulitcheva I. I. Spontaneous and Nitrosomethylurea-Induced Reversions in Plastome Chlorophyll Mutants of Sunflower *Helianthus annuus* L. // *Russian Journal of Genetics*, 2004. Vol.40. №2. – pp. 186—192.