

## МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИБРИДОВ МЕЖДУ ВНЕЯДЕРНЫМИ И ЯДЕРНЫМИ ХЛОРОФИЛЬНЫМИ МУТАНТАМИ ПОДСОЛНЕЧНИКА

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

Южный федеральный университет, Россия, 344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, e-mail: [usatova@mail.ru](mailto:usatova@mail.ru) [chenal1@yandex.ru](mailto:chenal1@yandex.ru)

---

Два хлорофильных внеядерных мутанта (*en:chlorina-6* и *en:chlorina-7*) из коллекции хлорофильных мутантов подсолнечника Южного федерального университета скрещивали в качестве материнских форм с мутантами того же типа (*n:chlorina-3* и *n:chlorina-5*), только с рецессивным ядерным контролем хлорофильных дефектов. Все гибриды  $F_1$  имели мутантную жёлто-зелёную окраску листьев, не отличаясь по содержанию хлорофиллов и показателям габитуса от соответствующих материнских форм *en:chlorina*. В  $F_2$  возникли жизнеспособные мутантные растения типа *xantha* (совмещенные формы). Показано, что у мутантов типа *xantha* показатели габитуса растений и содержания в листьях хлорофиллов значительно уступают соответствующим показателям мутантных родительских форм. Очевидно, в данном случае, совмещение в одном растении мутантных генетических систем ядра и пластид усугубляет хлорофильные дефекты. Полученные формы являются хорошей моделью для исследования тонких механизмов взаимодействия ядерного генома и пластома в биогенезе и функционировании хлоропластов.

Ключевые слова: внеядерный мутант, хлорофильная мутация, хлорофилл, подсолнечник.

## MORPHO-PHYSIOLOGIC ANALYSIS OF HYBRIDS BETWEEN NUCLEAR AND EXTRANUCLEAR CHLOROPHYLL MUTANTS OF SUNFLOWER

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

Southern Federal University, Russia, Rostov-on-Don, 344090, av. Stachki 194/1, e-mail: [usatova@mail.ru](mailto:usatova@mail.ru) [chenal1@yandex.ru](mailto:chenal1@yandex.ru)

---

Two chlorophyll extranuclear mutants (*en: chlorina-6* and *en: chlorina-7*) from the collection of chlorophyll mutant sunflower South Federal University crossed as maternal forms with mutants of the same type (*n:chlorina-3* and *n:chlorina-5*), with only recessive nuclear control of chlorophyll defects. All  $F_1$  hybrids had a mutant yellow-green color of the leaves, not differing in content of chlorophylls and gabitusa indicators from maternal forms of *en: chlorina*. In the  $F_2$  had viable mutant plants *xantha* type (combined form). It is shown that in mutants of *xantha* type indicators gabitusa and contents in leaves of chlorophylls far below the corresponding indicators of mutant parental forms. Obviously, in this case, combining in one plant mutant genetic systems of plastids and nucleus, increased chlorophyll defects. Obtained forms are a good model for the study of interactions between nuclear genome and plastome.

Key words: extranuclear mutant, chlorophyll mutation, chlorophyll, sunflower.

### Введение

В норме биогенез и функционирование хлоропластов находятся под генетическим контролем ядра и клеточных органелл, их гармоничным взаимодействием. Однако механизмы такого взаимодействия до сих пор изучены не достаточно глубоко (Даниленко, Давыденко, 2003). Многолетние исследования, проводимые в нашей лаборатории, всегда были направлены на решение большой и сложной проблемы пластидно-ядерных взаимоотношений (Белецкий, 1989; Зиноватная и др., 1995; Усатов и др., 2010).

Одним из перспективных подходов в этой области является создание и исследование генетических моделей, совмещающих в себе мутантные пластиды и ядерные хлорофильные

мутации. Коллекция хлорофильных мутантов различной генетической природы, имеющаяся в нашем распоряжении (Усатов и др., 2004а), является удобным исходным материалом для создания таких совмещённых форм. Широкий спектр хлорофильных мутаций, представленных в коллекции, позволяет наиболее полно охватить функциональные взаимосвязи между клеточными компартментами растительной клетки (Усатов и др., 2004б; Рассадина и др., 2005). Уникальность коллекции заключается в том, что все хлорофильные мутанты получены с помощью N-нитрозо-N-метилмочевины (НММ) на генетической основе одной инбредной линии (Усатов и др., 1995; Усатов и др., 2005).

Целью работы является совмещение и анализ в одном растительном организме мутантного пластома с хлорофильными мутациями ядерной природы подсолнечника.

### **Материал и методы**

Объектом исследований служили растения исходной линии 3629 подсолнечника *Helianthus annuus L.*, также хлорофильные ядерные монорецессивные (*n:chlorina-3*, *n:chlorina-5*) и пластомные мутанты (*en:chlorina-6*, *en:chlorina-7*), полученные на её генетической основе. Совмещение мутантных пластид с мутантными ядерными генами проводили с предварительной кастрацией цветков и искусственным опылением с последующей изоляцией соцветий по следующей схеме:

Родители – рНН x Phh

F<sub>1</sub> - рНh

F<sub>2</sub> – 1рНН : 2рНh : 1phh, где

Р – нормальный пластом, р – мутантный пластом, Н и h – ядерные хлорофильные гены дикого и мутантного типов, соответственно.

Поскольку передача пластома у подсолнечника происходит строго по материнской линии, внеядерные хлорофильные мутанты *en:chlorina-6* и *en:chlorina-7* использовали в гибридизации в качестве материнских растений. Изучали F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub> поколения. Для статистической оценки результатов расщепления применяли метод  $\chi^2$ . У линий и гибридов F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> в фазу бутонизации в листьях определяли содержание хлорофиллов (Гавриленко и др., 1975), а в фазу полного созревания высоту растений и диаметр корзинок. В промерах использовали не менее 20 растений каждой формы. Статистическую значимость результатов оценивали по критерию Стьюдента (Бейли, 1973).

### **Результаты и их обсуждение**

В F<sub>1</sub> были получены 4 гибридные формы. Две из них – с мутантным пластомом *en:chlorina-6* и рецессивными хлорофильными мутациями *n:chlorina-3* и *n:chlorina-5* в гетерозиготном состоянии и две – с пластомом *en:chlorina-7* с соответствующими ядерными генами. Все растения 1-го гибридного поколения этих скрещиваний имели мутантную

жёлто-зелёную окраску листьев, не отличаясь по содержанию хлорофиллов и показателям габитуса от материнских форм *en:chlorina*.

Результаты изучения  $F_2$  представлены в таблице 1. Во 2-м гибридном поколении, как и в 1-м, все растения имеют мутантный пластом. В дополнении к этому, у 1/4 растений мутантный ядерно-рецессивный хлорофильный ген находится в гомозиготном состоянии. Вследствие этого у гибридов в  $F_2$  наблюдается расщепление на два типа растений: *chlorina*, то есть растения, фенотипически повторяющие материнскую форму, и растения промежуточного типа между жёлто-зелёной *chlorina* и *xantha* (летальный тип хлорофильной мутации с жёлтым цветом листьев). В нашем случае промежуточные формы были представлены жизнеспособными растениями с резко уменьшенным габитусом и количеством зелёных пигментов по сравнению с мутантными родителями (табл. 2). В двух гибридных скрещиваниях *en:chlorina-7* х *n:chlorina-3* и *en:chlorina-7* х *n:chlorina-5* наблюдается классическое менделевское расщепление, т.е. 1/4 таких растений с усилением дефекта окраски, что соответствует количеству растений, несущих хлорофилл-мутантный ядерный ген в гомозиготном состоянии. У гибридов *en:chlorina-6* х *n:chlorina-3* и *en:chlorina-6* х *n:chlorina-5* числовые отношения при расщеплении значительно отклоняются от теоретически ожидаемого 3:1 (табл. 1).

Таблица 1

Расщепление в потомстве гибридов  $F_1$

Вид скрещивания	Фенотип растений $F_2$		$\chi^2$ , P
	<i>xantha</i>	<i>chlorina</i>	
<i>en:chlorina-6</i> х <i>n:chlorina-3</i>	33	149	4,579; P>0,05
<i>en:chlorina-6</i> х <i>n:chlorina-5</i>	37	163	4,507; P>0,05
<i>en:chlorina-7</i> х <i>n:chlorina-3</i>	58	181	0,068; P<0,05
<i>en:chlorina-7</i> х <i>n:chlorina-5</i>	46	149	0,207; P<0,05

Возможно, совмещение мутантного хлорофильного ядерного гена и мутантных пластид, усугубляя хлорофильный дефект и понижая жизнеспособность гибридных растений, обуславливает нехватку гомозигот по ядерному хлорофильному гену.

В таблице 2 приведены результаты полевых измерений габитуса растений и содержания хлорофиллов контрольной зеленой линии 3629, исходных мутантов *chlorina* и

гибридов  $F_2$  типа *xantha*. Видно, что родительские мутанты *chlorina* отличаются от исходных зеленых растений линии 3629 по высоте (64,6 % – 82,8 %) и диаметру корзинки (60,4 % – 76,2 %). Причем самые низкие показатели габитуса представлены у мутанта *n:chlorina-3*, а самые высокие – у *en:chlorina-7*.

Таблица 2

Показатели габитуса растений и содержания хлорофиллов у зеленой линии 3629, мутантов *chlorina* и гибридов  $F_2$  типа *xantha*

Линии и гибриды	Высота растений, см	Диаметр корзинки, см	Содержание хлорофил. а+в, мг/г абс. сух. веса
<b>3629</b>	<b>108,9 ± 2,7</b>	<b>10,1 ± 0,7</b>	<b>7,52 ± 0,23</b>
<i>en:chlorina-6</i>	84,4 ± 3,3	7,2 ± 0,4	6,21 ± 0,21
<i>en:chlorina-7</i>	90,2 ± 3,0	7,7 ± 0,5	5,78 ± 0,19
<i>n:chlorina-3</i>	70,3 ± 2,2	6,1 ± 0,4	5,11 ± 0,18
<i>n:chlorina-5</i>	79,8 ± 2,9	7,0 ± 0,4	4,60 ± 0,15
<i>en:chlorina-6</i> x <i>n:chlorina-3</i>	51,8 ± 2,7	5,2 ± 0,3	3,09 ± 0,22
<i>en:chlorina-6</i> x <i>n:chlorina-5</i>	57,2 ± 2,1	5,7 ± 0,4	2,67 ± 0,15
<i>en:chlorina-7</i> x <i>n:chlorina-3</i>	63,1 ± 2,4	5,6 ± 0,3	2,78 ± 0,17
<i>en:chlorina-7</i> x <i>n:chlorina-5</i>	68,3 ± 3,3	6,0 ± 0,4	2,57 ± 0,14

Хлорофильные ядерные гены, находясь в гомозиготном состоянии, в комбинации с мутантными пластогенами, существенно влияют на габитус гибридов  $F_2$ , снижая в различной степени показатели роста и диаметра корзинки, как по сравнению с материнскими внеядерными мутантами (*en:chlorina-6* и *en:chlorina-7*), так и отцовскими – ядерными (*n:chlorina-3* и *n:chlorina-5*), соответственно. При этом самые низкорослые формы получены в результате скрещивания *en:chlorina-6* x *n:chlorina-3* (47,6 % высота растений и 51,5 % диаметр корзинки от соответствующих показателей растений 3629), а самые мощные – в результате скрещивания *en:chlorina-7* x *n:chlorina-5* (62,7 % высота растений и 59,4 % диаметр корзинки от соответствующих показателей растений 3629).

Из таблицы 2 следует, что содержание хлорофиллов в пластомных мутантах *en-chlorina-6* и *en-chlorina-7* составляет только 82,6 % и 76,9 % от контроля, соответственно. В листьях ядерных хлорофильных мутантов *n:chlorina-3* и *n:chlorina-5* содержание зелёных пигментов ещё меньше – 68,0 % и 61,2 % от их содержания в норме. У гибридов  $F_2$  типа *xantha* содержание пигментов примерно вдвое ниже, чем у соответствующей родительской формы с наименьшим содержанием хлорофиллов.

Таким образом, во всех изученных комбинациях скрещиваний, при совмещении мутантных ядерных и пластидных генов, у гибридов с фенотипом *xantha* происходит резкое снижение показателей габитуса и содержания хлорофиллов, относительно не только зелёных растений 3629, но и жёлто-зелёных мутантов *chlorina*. Следовательно, объединение мутантных наследственных систем ядра и пластид вызывает значительное усиление хлорофильных дефектов. Полученные формы являются хорошей моделью для исследования тонких механизмов взаимодействия ядерного генома и пластома в биогенезе и функционирования хлоропластов.

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).

### Список литературы

1. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М.: Мир, 1973. – 271 с.
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. – 392 с.
4. Даниленко Н. Г., Давыденко О. Г. Миры геномов органелл. – Минск: Тэхналогія, 2003. – 494 с.
5. Зиноватная Г. Н., Улитчева Н. И., Гуськов Е. П. Комбинационная способность пластомных мутантных линий подсолнечника и проявление эффекта гетерозиса по количественным признакам у межмутантных гибридов // Генетика. – 1995. – Т. 31. – С. 1671–1678.
6. Рассадина В. В., Усатов А. В., Федоренко Г. М., Аверина Н. Г. Активность системы биосинтеза хлорофилла и структурно-функциональная организация хлоропластов в пластомном мутанте подсолнечника *en:chlorina-5* // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – № 5. – С. 683–693.

7. Усатов А. В., Машкина Е. В., Гуськов Е. П. Влияние окислительного стресса на мутагенез у подсолнечника *Helianthus annuus L.*, индуцированный нитрозометилмочевинной // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 1. – С. 63–70.
8. Усатов А. В., Разорителяева Е. К., Машкина Е. В., Улитчева И. И. Спонтанные и индуцированные нитрозометилмочевинной реверсии пластомных хлорофильных мутантов подсолнечника *Helianthus annuus* // Генетика. – 2004а. – Т. 40. – С. 248–255.
9. Усатов А. В., Рассадина В. В., Аверина Н. Г. и др. Структурно-функциональные особенности мутантных пластид внеядерных пестролистных форм подсолнечника // Физиология растений. – 2004б. – Т. 53. – С. 175–183.
10. 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.
11. Усатов А. В., Федоренко Г. М., Устенко А. А. и др. Нехромосомные мутации подсолнечника. – Ростов н/Д: ЮФУ. – 2010. – 264 с.

**Рецензенты:**

Чистяков В. А., доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментального мутагенеза НИИ биологии ЮФУ, 344090 г. Ростов-на-Дону.

Михайлов Н. В., доктор сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и биотехнологии НИИ биоинформатики, биотехнологии и живых систем ДонГАУ, 346493, Ростовская область, Октябрьский район, поселок Персиановский.