

Summary

Genetic constitution of cytoplasm in segregants for plastome chlorophyll deficiency gene obtained by mitotic segregation from heteroplasmic fusion products (cytoplasmic heterozygotes) of *Nicotiana* was studied. Plants from cells heterozygous for plasmagenes were obtained by fusion of callus protoplasts from plastome chlorophylldeficient mutant of tobacco with mesophyll protoplasts from either one of four cms-analogs of tobacco bearing *repanda*, *undulata*, *suaveolens*, and *plumbaginifolia* cytoplasm. In the study characters coded for by plasmagenes were analysed. The results of our investigation demonstrated that higher plant cell contains at least two cosegregation groups of plasmagenes: segregation group of plastome with corresponding type of chloroplast DNA segregate plastome chlorophyll deficiency, polypeptide composition of large subunit of ribulosebiphosphatecarboxylase/oxygenase (RUBISCO), tentoxine resistance and segregation group of chondriome-sets of species-specific restriction fragments of mitochondrial DNA segregate with the traits of cytoplasmic male sterility / fertility and corresponding changes of flower morphology.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.— Киев: Наук. думка, 1984.— 160 с.
2. Gleba Y. Y., Evans D. A. Hybridization of somatic plant cells: genetic analysis // Genetic engineering: principles and methods.— New York; London: Plenum press, 1984.— P. 175—210.
3. Levi A., Ridley B., Sink K. C. Biased organelle transmission in somatic hybrids of *Lycopersicon* and *Solanum-Lycopersicoides* // Curr. Genet.— 1988.— 14, N 2.— P. 177—182.
4. Smith M. A., Pay A., Dubits D. Analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs in asymmetric somatic hybrids between tobacco and carrot // Theor. and Appl. Genet.— 1989.— 77, N 5.— P. 641—644.
5. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. I. Hybrids and cybrids among the regenerates from cloned protoplast fusion products / Yu. Gleba, N. N. Kolesnik, I. V. Meshkene et al. // Ibid.— 1984.— 69, N 1.— P. 121—128.
6. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana* II. Plastome heterozygotes / Yu. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1985.— 198, N 3.— P. 476—481.
7. Wilson A. J., Chourey P. S. A rapid inextensive method for isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources // Plant Cell Rep.— 1984.— 3, N 6.— P. 237—239.
8. Kolodner R., Tewari K. K. The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants // Biochim. et biophys. acta.— 1975.— 402, N 3.— P. 372—384.
9. Segregation of organelle traits following protoplast fusion in *Nicotiana* / C. E. Flick, S. F. Kut, J. E. Bravo et al. // Biotechnology.— 1985.— 3, N 6.— P. 555—560.
10. Maliga P., Fejes E. Physical evidence for recombination of chloroplast DNA in somatic hybrid of *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia* // Freeling M (ed) plant genetics.— New York: Alan R. Liss, 1985.— P. 641—650.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.133:575.153:575.155

Л. А. Ковлер, Л. Р. Шлумуков, Ю. Ю. Глеба

АНАЛИЗ ТИЛАКОИДНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ У МЕЖТРИБНЫХ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле исследован состав тилакоидных полипептидов хлоропластов межтрибных гибридов *Nicotiana tabacum*+*Scopolia carniolica*, *N. tabacum*+*Physochlaine officinalis*, *N. tabacum*+*Lycium barbarum*. Во всех комбинациях обнаружено изменение состава белков светособирающего комплекса фото-

© Л. А. Ковлер, Л. Р. Шлумуков, Ю. Ю. Глеба, 1991.

системы II, которое проявляется в возникновении четырех дополнительных полипептидов. Сделан вывод о том, что это происходит вследствие дискоординации ядерного и пластидного геномов в ходе биогенеза хлоропластов.

Введение. Метод соматической гибридизации позволяет преодолевать барьеры скрещиваемости, присущие половому процессу [1, 2], и получать фертильные гибриды, сочетающие генетический материал филогенетически отдаленных растений [3]. В качестве маркеров соматической гибридизации было предложено использовать мембранные белки тилакоидов хлоропластов [4]. Тилакоидные полипептиды кодируются частично ядром, частично хлоропластами, что позволяет установить как геномную, так и пластомную конституцию гибридов. Однако такой анализ информативен только для филогенетически отдаленных видов, поскольку наборы тилакоидных полипептидов близкородственных видов весьма консервативны [4].

Анализируемые в настоящей работе фертильные гибридные растения *N. tabacum* + *S. carniolica*, *N. tabacum* + *P. officinalis*, *N. tabacum* + *L. barbarum* морфологически совершенны. Тем не менее можно ожидать появления нарушений на генетическом уровне вследствие взаимодействия чужеродных ядра и цитоплазмы [4]. У гибрида *N. tabacum* + *A. belladonna* обнаружено изменение состава светособирающего комплекса фотосистемы II (ФС II) [4, 5]. Чтобы решить, является это нарушение уникальным явлением или закономерным следствием ядерно-цитоплазматической несовместимости, были исследованы растения с аналогичной генетической конституцией.

Материалы и методы. Цитоплазматические гибриды, полученные слиянием протопластов, любезно предоставлены С. Г. Кушниром. Для анализа были взяты следующие линии: ScoII (*N. tabacum* (геном), *S. carniolica* (пластом)); PofI и Pof4F2 (*N. tabacum* (геном), *P. officinalis* (пластом)), Lic14 и Lic5F1 (*N. tabacum* (геном), *L. barbarum* (пластом)); W2 и WiF (реконструированные растения *N. tabacum* (геном и пластом)), а также линии родителей *N. tabacum* SR1, *S. carniolica* (дикий тип), *P. officinalis* (дикий тип), *L. barbarum* (дикий тип), *A. belladonna* (дикий тип) [3, 6]. Асимметричный ядерный гибрид *N. tabacum* сорт *Lechia* + *A. belladonna* и линии родителей любезно предоставлены М. К. Зубко.

Тилакоиды выделяли по методу [7]. Для удаления крахмала их насаивали на двухступенчатый (28—55 %) градиент концентрации сахарозы и центрифугировали при 25 000 об/мин и 4 °С 30 мин (центрифуга «Beckman-L8M», ротор SW 40Ti) [8]. Очищенные и отмые в бидистиллированной воде тилакоиды служили источником получения хлорофилл-белковых комплексов. Во все растворы добавляли 1 мМ ФМСФ в качестве ингибитора протеаз.

Светособирающие хлорофилл-белковые комплексы ФС II выделяли из тилакоидов, растворенных в 0,06 М Na₂CO₃, 0,06 М β-меркаптоэтаноле, 2,5 % DS-Li (додецилсульфат лития), 12 % сахарозы, с помощью двукратного электрофореза (ЭФ) в 15- и 8 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при низкой температуре по методу [9]. После ЭФ кусочки геля вырезали, измельчали и оставляли в буфере (0,1 % DS-Li, 0,06 М Na₂CO₃, 0,06 М β-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ) на ночь при 4 °С для экстракции комплексов из геля. Затем комплексы концентрировали с помощью погружаемых мембран CX-10 (фирма «Millipore», США) и медленно использовали для ЭФ.

ЭФ тилакоидов и выделенных комплексов осуществляли в градиенте концентрации ПААГ (7—20 %), как описано в работе [10].

Тилакоидные полипептиды идентифицировали по молекулярным массам (м. м.) в сравнении с результатами работы [11], а светособирающие комплексы ФС II — электрофоретической очисткой по [9].

Результаты и обсуждение. В наших условиях тилакоидные полипептиды разделяются примерно на 30 полос. Точная идентификация полипептидов каждого белкового комплекса представляет собой отдельную

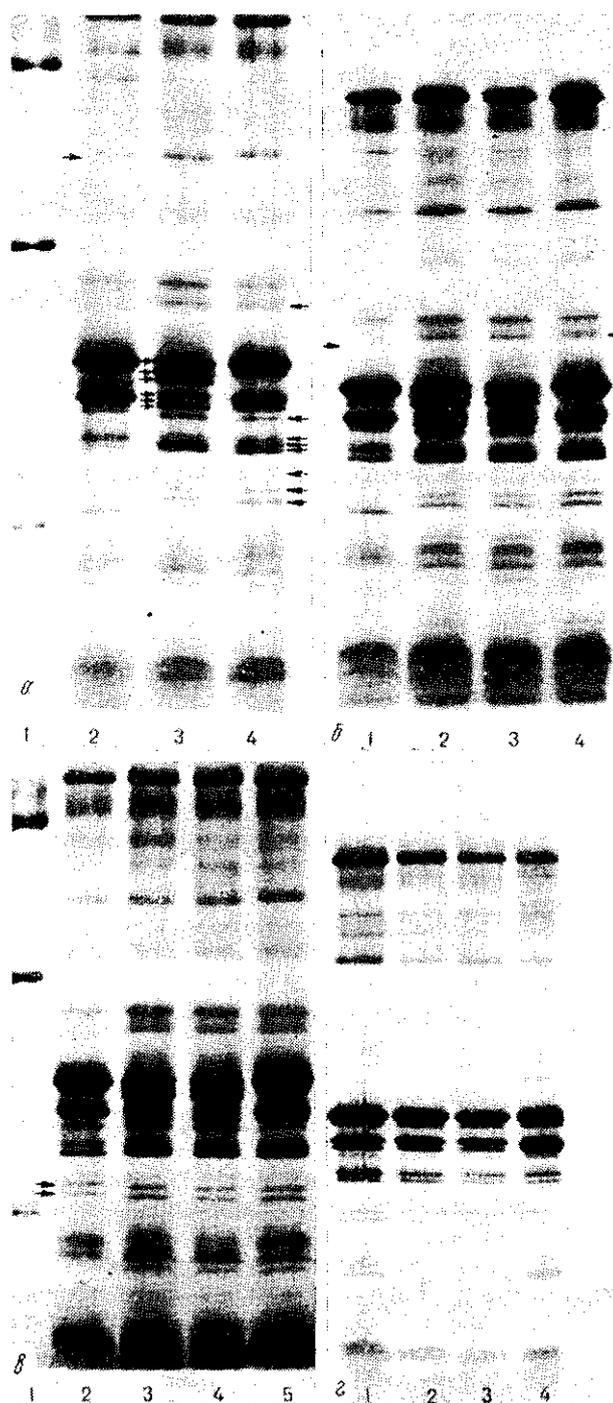


Рис. 1

задачу. Такая работа для табака была осуществлена в [11]. Среди объектов, исследованных нами, наиболее интересными оказались полипептиды светособирающего комплекса ФС II. Поэтому более детально охарактеризованы именно эти полипептиды. Остальные белки оценены по молекулярной массе. Наследование генов тилакоидных полипептидов у гибридов определяли по белкам, различающимся у родителей (маркерные полипептиды) в сравнении с данными работы [11].

На рис. 1 представлены результаты денатурирующего ЭФ в гради-

енте концентрации ПААГ (7—20 %) тилакоидных полипептидов: *a* — *N. Tabacum*+*S. carniolica* (1 — стандарты м. м. 60 000; 36 000; 18 500; 2 — *S. carniolica*, стрелкой указан белок с м. м. 47 300; 3 — линия Sco2, стрелками указаны белки с м. м. ($\cdot 10^3$) 27,5; 26,7; 26,1; 25,1; 24,8; 24,4; 4 — *N. tabacum*, линия SR1, стрелками указаны белки ($\cdot 10^3$) 32,4; 24,3; 23,1; 22,8; 22,5; 21,3; 20,2 и 19,1; *б* — *N. tabacum* + *P. officinalis* (1 — *P. officinalis*, стрелкой указан белок с м. м. 31 100; 2 — линия Pof1; 3 — линия Pof4F2; 4 — *N. tabacum*, линия SR1, стрелкой указан белок с м. м. 31 600); *в* — *N. tabacum*+*L. barbarum* (1 — стандарты м. м. 60 000; 36 000; 18 500; 2 — *L. barbarum*, стрелками указаны белки с м. м. 19 700 и 19 100; 3 — линия Lic14; 4 — линия Lic5F1; 5 — *N. tabacum*, линия SR1); *г* — реконструированные растения *N. tabacum* (1 — *N. tabacum*, линия SR1; 2 — линия W2i; 3 — линия WiF; 4 — *A. belladonna*). Полипептид 47 300, наследуемый цибридом от скополии, вероятно, входит в состав реакционного центра ФС II (рис. 1, *a*). Белки с м. м. 32 400, 23 100, 22 800, 22 500 наследуются цибридом от табака и, вероятно, входят в состав кислород-освобождающего комплекса. Белок с м. м. 24 300, скорее всего, является белком светособирающего комплекса ФС I. Группа белков 21 300, 20 200, 19 100, также наследуемых от табака, очевидно, принадлежит ФС I. В области м. м. 27 500—24 400 у цибридов появлялись дополнительные полосы, отсутствующие у обоих родителей.

При электрофорезе тилакоидов *N. tabacum*, *P. officinalis* и цибридов Pof1 и Pof4F2 (см. рис. 1, *б*) наблюдалась картина, сходная с предыдущей. Из полипептидов, кодируемых пластомом, у родителей отчетливо разделяются белки реакционного центра ФС II (47 100 у табака и 46 200 у физохлайна).

Остальные маркерные полипептиды кодируются ядром и наследуются цибридом от табака. В области белков светособирающего комплекса ФС II (27 500—24 400) возникают дополнительные полосы (аналогично предыдущему случаю).

В отличие от скополии и физохлайна, у дерезы (см. рис. 1, *в*) в области белков ФС I наблюдаются две полосы (19 700 и 19 100), в то время как скополия и физохлайн имеют в этой области по одной полосе. Набор тилакоидных полипептидов и состав белков светособирающего комплекса ФС II у цибрида *N. tabacum* + *L. barbarum* аналогичны описанным выше.

При слиянии клеток пластомного мутанта табака (линии DSR) и белого цибрида *A. belladonna* + *N. tabacum*, имеющего ядро красавки и пластиды табака линии SR1, предшественника мутанта DSR, получены две линии W2i и WiF *N. tabacum* (см. рис. 1, *г*) [3]. У зеленых, фертильных растений *N. tabacum*, имеющих хлоропластную ДНК типа табака [3], как оказалось, состав тилакоидных мембран полностью соответствует таковому табака линии SR1.

На рис. 2 приведены результаты денатурирующего электрофореза в градиенте концентрации ПААГ (7—20 %) светособирающих комплексов ФС II: *a* — *N. tabacum*+*S. carniolica* (1 — *S. carniolica*; 2, 3 — линия Sco2, стрелками указаны белки с м. м. ($\cdot 10^3$) 26,7; 26,1; 24,8 и 24,4; 4 — *N. tabacum*, линия SR1); *б* — *N. tabacum* + *P. officinalis* (1 — *P. officinalis*; 2 — линия Pof1; 3 — *N. tabacum*, линия SR1); *в* — *N. tabacum*+*L. barbarum* (1 — *N. tabacum*, линия SR1; 2 — линия Lic5F1; 3 — *L. barbarum*).

У скополии и табака ярко выражены две белковые полосы 27 500 и 25 100. У цибридов появляются дополнительные четыре полосы. Распределение белковых полос очищенных комплексов комбинаций табак — физохлайн (см. рис. 2, *б*) и табак — дереза (см. рис. 2, *в*) аналогично предыдущему случаю.

Таким образом, во всех исследованных цибридах, имеющих три различные комбинации ядра и хлоропластов, распределение белковых полос при ЭФ тилакоидных полипептидов имеет сходный характер.

В составе белков светособирающего комплекса ФС II у всех цибридов возникают дополнительные полипептиды, отсутствующие у родителей.

Данные ЭФ анализа тилакоидных полипептидов свидетельствуют о том, что мембранные белки тилакоидов хлоропластов служат хорошими маркерами при получении отдаленных соматических гибридов. Кроме того, такой анализ позволяет обнаружить ядерно-цитоплазматическую несовместимость, не проявляющуюся на фенотипическом уровне.

Наиболее интересным результатом описанных экспериментов является нарушение у цибридов экспрессии генов полипептидов светособи-

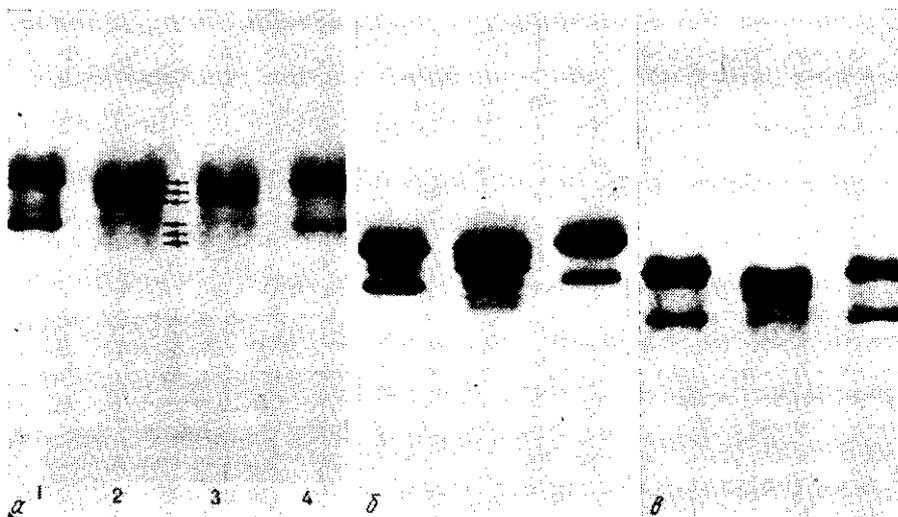


Рис. 2

рающего комплекса ФС II. Белки комплекса кодируются ядром [12, 13]. Поэтому можно было ожидать, что у цибридов, имеющих ядро табака, белковый состав комплекса будет аналогичным таковому табака [11, 14]. В наших условиях у табака обнаружены две ярко выраженные полосы с м. м. 27 500 и 25 100; у цибридов — шесть полос — 27 500, 26 700, 26 100, 25 100, 24 800 и 24 400.

В связи с сильными нарушениями биогенеза тилакоидов у хлорофилл-дефектного мутанта табака линии DSR, служившего в экспериментах по слиянию донором ядерных генов [3, 5], при анализе тилакоидов использовали его предшественник, табак линии SR1. Мы решили проверить, не является ли нарушение экспрессии генов полипептидов светособирающего комплекса ФС II следствием ядерной мутации, которая могла случайно возникнуть при индукции хлорофиллдефектности. Был проведен анализ двух линий растений табака W2i и WiF, описанных выше, который показал, что нарушения экспрессии генов белков светособирающего комплекса ФС II не наблюдается.

Кроме того, исследовали такие комплексы у асимметричных гибридов, имеющих геном другой линии табака *N. tabacum* (сорт *Lechia*) в сочетании с небольшим количеством ядерного генетического материала *A. belladonna* и пластом *A. belladonna*. Было обнаружено аналогичное изменение в составе этого комплекса.

Таким образом, ядерная мутация как причина изменения состава полипептидов светособирающего комплекса ФС II исключается. Можно сделать вывод о том, что наблюдаемое явление — следствие дискоординации ядерного и пластидного геномов в ходе биогенеза хлоропластов у филогенетически отдаленных гибридов.

Очевидно, ядерно-цитоплазматические взаимодействия в таких растениях несовершенны. Возможно, начинают экспрессироваться молчащие гены табака. Это можно предположить, поскольку ядерные гены,

кодирующие эти полипептиды, образуют мультигенные семейства у многих видов растений, в том числе и рода *Nicotiana* [12, 16—18]. Возможно и другое объяснение. Известно, что полипептиды светособирающего комплекса ФС II синтезируются в цитоплазме в виде предшественников. Затем они доставляются в хлоропласты с помощью пептидапереносчика (36—37 аминокислот) посредством энергозависимого посттрансляционного механизма и собираются в тилакоидных мембранах с молекулами хлорофиллов в виде комплексов [12, 13, 19, 20]. Авторы работ [19, 20] провели специальные исследования по изучению последовательности и механизмов этого процесса и обнаружили, что для встройки полипептидов в тилакоиды необходим белковый стромальный фактор, действующий специфически. Можно предположить, что появление дополнительных белков у гибридов происходит вследствие нарушения этапа протеолиза при встройке чужеродных ядерных белков в хлоропласт.

Выяснение действительной причины наблюдаемого явления составляет предмет дальнейших исследований.

Резюме

За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі вивчено склад тилакоїдних поліпептидів хлоропластів міжтрибних гібридів *Nicotiana tabacum*+*Scopolia carniolica*, *N. tabacum*+*Physocytaine officinalis*, *N. tabacum*+*Lycium barbarum*. В усіх комбінаціях виявлено зміну в складі білків світлозбираючого комплексу фотосистеми II, яка проявляється у виникненні чотирьох додаткових поліпептидів. Зроблено висновок, що це відбувається внаслідок дискоординації ядерного та пластидного геномів в процесі біогенезу хлоропластів.

Summary

The chloroplast thylakoid polypeptides of the intertribal cybrids *Nicotiana tabacum*+*Scopolia carniolica*, *N. tabacum*+*Physocytaine officinalis*, *N. tabacum*+*Lycium barbarum* were studied by PAGE. The alteration of the protein composition of the light-harvesting complex of PS II was found in all combinations which results in the appearance of four extra polypeptides. It was concluded that this phenomena is due to discoordination between nuclear and plastide genomes during chloroplast biogenesis.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений.— Киев: Наук. думка, 1982.— 104 с.
2. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.— Киев: Наук. думка, 1985.— 132 с.
3. Кушнір С. Г. Межтрибные цитоплазматические гибриды в семействе пасленовых: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1989.— 16 с.
4. Шлумуков Л. Р. Белки хлоропластов как маркеры соматической гибридизации высших растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1989.— 15 с.
5. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome S. G. Kushnir, L. R. Shlumukov, N. J. Pogrebnyak et al. // Mol. and Gen. Genet. — 1987.— 209, N 1.— P. 159—163.
6. Somatic hybrids and cybrids between the members of different tribes of *Solananceae* S. Kushnir, E. Babyichuk, A. Shakhovsky et al. // VIIIth Int. Congr. on plant tissue and cell culture: Abstrs.— Amsterdam, 1990.— P. 213.
7. Chlorophyll-protein complexes fractionated from intact chloroplasts / J. P. Markwell, H. Y. Nakatani, J. Barter, J. P. Thornber // FEBS Lett.— 1980.— 122, N 1.— P. 149—153.
8. Биохимический анализ в клеточной инженерии растений.— Киев, 1988.— 49 с. (Препринт / АН УССР. Ин-т ботаники; № 88.1)
9. Delepleaire P., Chua N.-H. Isolation, purification and characterization of chlorophyll-protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis at low temperature // Meth. in chloroplast mol. biol. / Eds M. Edelman et al.— Amsterdam etc.: Elsevier, 1982.— P. 835—845.
10. Piccioni R., Bellemare G., Chua N.-H. Methods of polyacrylamide gel electrophoresis in the analysis and preparation of plant peptides // Ibid.— P. 985—1014.

- 11 Characterization of cytoplasmic mutants of *Nicotiana tabacum* with altered photosynthetic function / C. T. Chia, J. H. Duesing, J. L. Watson et al. // *Curr. Gen.*—1986.— N 10.— P. 469—479.
- 12 Steinback K. E., Arntzen C. J., Bogorad L. The physical organization and genetic determination of the photosynthetic apparatus // *Mol. Biol. of the photosynthetic apparatus* / Eds K. E. Steinback et al.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1985.— P. 1—19.
- 13 Thornber J. P. Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organism // *Encyclopedia of plant physiol. Photosynthesis III. Photosynthetic membranes and light harvesting systems* / Eds L. A. Staehelin, C. J. Arntzen.—Berlin etc.: Springer, 1986.—Vol. 19.—P. 98—142.
- 14 Remy R., Ambard-Bretteville F. A. High resolution two-dimensional electrophoresis of thylakoid proteins using 3-[(3-*cholamidopropyl*)dimethylammonio]-1-propanesulfonate and sodium dodecyl sulfate as detergents // *Physiol. Veg.*—1985.—23, N 4.— P. 389—395.
- 15 Molecular characterization of two clusters of genes encoding the type I CAB polypeptides of PS II in *Nicotiana plumbaginifolia* // *Plant Mol. Biol.*—1987.—10, N 2.— P. 117—126.
- 16 Polans N. O., Weeden R. F., Thompson W. F. Inheritance, organization and mapping of *rbc S* and *Cab* multigene families in pea // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 15.—P. 5083—5087.
- 17 Dunsmair P., Smith S. M., Bedbrook J. The major chlorophyll a/b-binding protein of petunia is composed of several polypeptides encoded by a number of distinct nuclear genes // *J. Mol. and Appl. Genet.*—1983.—2, N 2.—P. 285—300.
- 18 Structure and expression of nuclear genes encoding polypeptides of the photosynthetic apparatus / M. P. Timko, A. P. Kaush, J. M. Hand, A. R. Cashmore // *Mol. Biol. of photosynthetic apparatus* / Eds K. E. Steinback et al.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1985.—P. 381—396.
- 19 Chitnis P. R., Nechushtai R., Thornber J. P. Insertion of the precursor of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein into thylakoids requires the presence of a developmentally regulated stromal factor // *Plant Mol. Biol.*—1987.—10, N 1.—P. 3—11.
- 20 Assembly of the barley light-harvesting chlorophyll a/b-proteins in barley involves processing of the precursor on thylakoids / P. R. Chitnis, D. T. Morishige, R. Nechushtai, J. P. Thornber // *Ibid.*—1988.—11, N 2.—P. 95—107.

Инт. клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

СЛЖ 577.113:633.71

И. Н. Череп, И. К. Комарицкий

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ РОДА NICOTIANA

Проведен рестриктивный анализ митохондриальной (мт) ДНК 38 видов рода *Nicotiana* для установления филогенетических связей между видами рода. Сравнение наборов фрагментов, образующихся при действии четырех рестриктаз, показало, что большинство из 38 мтДНК претерпели внутренние перестройки и существенно различаются между собой. По степени дивергенции мтДНК изученные виды секции *Suaevolens* образуют две отдельные группы.

Введение. Род *Nicotiana*, состоящий из 70 видов, с генетической стороны своеобразный. Гаплоидные (базовые) числа хромосом настоящих видов составляют 9, 10, 12, 16, 18, 19, 20, 22, 24. Анеуплоидия, как показывают данные числа, — характерное явление для рода. Девяти- и десяти-хромосомные виды возникли от 12-парных, а 16—22 — от 24-парных [1]. Важную роль в дифференциации рода играет естественная гибридизация, повышающая плоидность. Последняя коррелирует, как правило, с количеством полипептидов малой субъединицы Рубиско [2]. Было предположено, что настоящий вид *N. glutinosa* ($n=12$) возник в результате аллополидизации между двумя 6-хромосомными видами [3]. Другой вид *N. langsdorfii* ($n=9$) мог возникнуть в результате аллополидизации между двумя диплоидными предшественниками ($n=6$) [4].

Митохондриальная (мт) ДНК рода изучена мало. В литературе имеются отрывочные сведения об организации мтДНК *Nicotiana*.

© И. Н. Череп, И. К. Комарицкий, 1991.