

## АНАЛИЗ ПРИРОДЫ ЛЕТАЛЬНЫХ ПЛАСТОМНЫХ МУТАЦИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА, ИНДУЦИРОВАННЫХ N-НИТРОЗО-N-МЕТИЛМОЧЕВИНОЙ

С. Ф. ТАРАН, Э. Я. ПРИХОЖЕНКО, Ю. Д. БЕЛЕЦКИЙ

Пластомные мутанты высших растений широко используются в последнее время как модели для выяснения многих сторон пластидно-ядерных взаимоотношений, исследования структуры и особенно функции генетического материала пластид [17, 18]. Их изучение дает возможность судить о молекулярной природе этих мутаций. В итоге исследование мутантов должно сводиться к установлению первичного эффекта пластидной мутации. В связи с этим нами изучался качественный состав рРНК, активность рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы (РБФК) и ультраструктура пластид пластомных мутантов подсолнечника, индуцированных при помощи N-нитрозо-N-метилмочевины [1, 7, 8].

**Материалы и методы.** Фенотипически исследуемые мутанты характеризуются наличием на листьях желтых (белых) участков самых различных размеров (рис. 1).

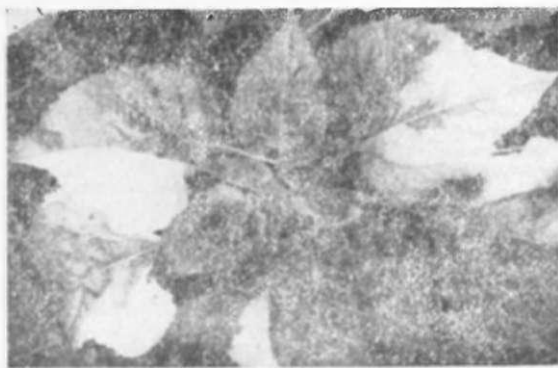


Рис. 1. Общий вид пестролистного растения.

В экспериментах использовали желтые участки зрелых листьев четырех пестролистных линий 2—22, 2—24, 2—25, 2—42. Контролем служила исходная инбредная линия 3629.

Суммарный препарат рРНК выделяли из листьев и фракции пластид методом фенольной депротенинизации [3]. Выделение хлоропластов проводили по методу Курсанова и др. [14]. Содержание РНК определяли спектрофотометрически [13]. Диск-электрофоретическое разделение высокомолекулярной рРНК проводили в 2,5%-ном ПААГ [19]. На каждую трубочку геля наносили по 100 мкг РНК. В качестве красителя использовали метиленовый синий.

Для электронного микроскопического исследования пластид применяли методiku, описанную ранее [7].

Растворимых белков материал гомогенизировали в двухкратном объеме 0,1 M трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 0,2 M NaCl, 0,0005 M ЭДТА, 0,01 M MgCl<sub>2</sub> и 0,06 M 2-меркаптоэтанол. После полуторачасового центрифугирования гомогената при 2000 g проводили разделение растворимых белков супернатанта в 7,5%-ном ПААГ при pH 9,5 [5]. В каждую трубочку вносили

по 100—200 мкг белка, количество которого определяли по методу Лоури [21]. Активность РБФ-карбоксилазы определяли радиометрически при 30°C [9]. Радиоактивность считали на газопроточном счетчике 2154-1-1М.

**Результаты и обсуждение.** Мутантные участки листьев исследуемых нами пестролистных линий содержат лишь следы зеленых пигментов, что сопровождается глубокими изменениями ультраструктуры пластид. Строение хлоропластов подсолнечника дикого типа типично для хлоропластов высших растений. В органелле, имеющей двойную мембрану, видна мощно развитая тилакоидная система, большое количество пластидных 70S рибосом, крахмальные зерна и осмиофильные глобулы (рис. 2). Мутантные пластиды (рис. 3) в лучшем случае имеют

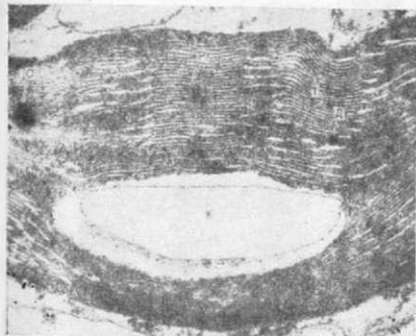


Рис. 2. Ультраструктура хлоропласта в норме. Ув.  $\times 56\,580$ .

Т — тилакоиды; О — осмиофильные глобулы; Р — рибосомы 70S; К — крахмальное зерно; Д — ДНК-содержащие участки.



Рис. 3. Ультраструктура мутантной пластиды (линия 2—42). Ув.  $\times 39\,790$ .

лишь слабо развитые тилакоиды стромы, что является еще одним подтверждением того, что между образованием тилакоидной системы в хлоропластах и синтезом хлорофилла существует тесная взаимосвязь [10, 12]. Наличие пигментов необходимо для образования специфической мембранной структуры, а она в свою очередь нужна для непрерывного синтеза хлорофилла [12]. Кроме того, меняется форма мутантных пластид. Несмотря на глубокие изменения ультраструктуры, желтые пластиды содержат значительное количество рибосом, а также ДНК, о чем свидетельствует наличие в матриксе электронно-прозрачных участков (рис. 3).

Полученные данные подтверждаются результатами определения рРНК пластид у мутантов. Примененный нами метод [19] позволяет отделять высокомолекулярную рРНК от низкомолекулярной. Недеградированная высокомолекулярная рРНК делится на четыре зоны (рис. 4). Зоны I и III соответствуют 25S и 18S рРНК цитоплазматических 80S рибосом; зоны II и IV — 23S и 16S рРНК пластидных 70S рибосом [14, 20]. При разделении рРНК, выделенной из препаратов хлоропластов, появлялись лишь зоны II и IV. По данным других авторов именно эти зоны можно обнаружить на электрофореграммах [17, 15].

Выделение и фракционирование высокомолекулярных РНК мутантов не обнаружило существенных отличий от контроля: мутантные пластиды содержат те же рРНК, что и хлоропласты исходной линии 3629.

Наличие рРНК и рибосом в мутантных пластидах еще не свидетельствует о том, что в органелльных рибосомах осуществляется синтез белка. Для решения этого вопроса у мутантов определяли активность РБФ-карбоксилазы, большая субъединица которой кодируется пластомом [22, 23]. Известно, что фракция белка, имеющая РБФ-карбоксилазную активность, составляет в норме 50% всех растворимых белков растения [22]. В полном соответствии с этим электрофоретическое исследование спектра растворимых белков выявило одну наиболее интенсивную высокомолекулярную белковую зону. Радиометрический анализ подтвердил, что данная белковая зона обладает РБФ-карбоксилазной активностью. Результаты, представленные на рис. 5, сви-

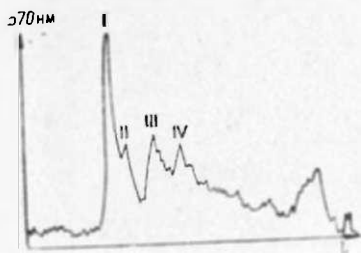


Рис. 4. Субъединицы рРНК из зеленых и мутантных тканей. I — 25 S, II — 25 S, III — 18 S, IV — 16 S.

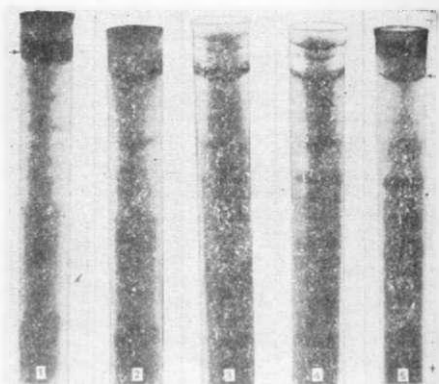


Рис. 5. Схема электрофореграмм фракции растворимых белков дикой линии 3629 (1) и пластомных мутантов 2—42 (2), 2—25 (3), 2—24 (4), 2—22 (5).

Стрелкой показана зона РБФ-карбоксилазной активности.

дествуют о том, что исследуемые мутанты, хотя и в меньшей степени, чем исходная линия, синтезируют РБФК. Поскольку большая субъединица этого фермента синтезируется на рибосомах пластида, можно сделать вывод, что в мутантных пластидах функционируют 70S рибосомы. Более того, пластоген, определяющий структуру большой субъединицы этого фермента, функционально активен. Следовательно, можно сделать вывод, что выявленные нами мутации не представляют собой крупных делеций в тех участках пластидного генетического материала, где локализованы гены рРНК и большой субъединицы РБФК. Изменения в структуре ДНК могли бы быть различными — делециями мутациями, блокирующими синтез большой субъединицы РБФК и рРНК.

Однако следует заметить, что в случае мутации, возникающей за счет замены кодона глутамином, вполне возможно, способность к спонтанной реверсии к исходному типу. Однако возврата к зеленой окраске у исследуемых мутантов, за исключением мутанта типа *Chlorina* [2], мы не наблюдали. Следовательно, мутации, выявленные нами наследственные изменения структуры генов «зеленой линии». В литературе описан спонтанный мутант *Chlorina* и мутация, вызывающая изменение структуры генов пластида [11].

Следует заметить, что структуру обнаруживаемое нарушение струк-

туры и функции хлоропластов является вторичным [10], и снижение активности РБФК мутантов может быть обусловлено наличием сложных регуляторных связей, имеющих место в процессе биогенеза и функционирования пластид.

**Выводы.** У 4 желтых пластомных мутантов подсолнечника обнаружены все субъединицы высокомолекулярных рРНК и РБФ-карбоксилазная активность. Мутантные пластиды имеют органельные 70S рибосомы при почти полном отсутствии тилакоидной системы. Генетический материал мутантных пластид не содержит крупных делеций в районах локализации генов рРНК и большой субъединицы РБФК.

#### Summary

In the mutant yellow spores of the leaves of four sunflower variegated lines the quality contents of rRNA, the existence of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity were determined and mutant plastid ultrastructure was studied.

It is established that mutants studied have the functionally active plastid ribosomes 70 S alongside with sharp breakage of fine structure of plastids.

Mutant plastid chromosome is concluded to contain no large deletions in rRNA gene sites and no large RuBPCase subunit.

#### УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белецкий Ю. Д., Разорителева Е. К., Жданов Ю. А. Цитоплазматические мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозо-N-метилмочевниной. — Докл. АН СССР, 1969, т. 186, № 6, с. 1425—1426.
2. Белецкий Ю. Д., Федоренко Г. М., Разорителева Е. К., Степанова Л. Б. Реверсия у пластомного мутанта подсолнечника типа Chlorina. — Цитология и генетика, 1981, т. 15, № 1, с. 34—38.
3. Кулаева О. Н., Селиванкина С. Ю., Романко Е. Г. Выделение суммарного препарата РНК из растений и его последующее фракционирование. — В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971, с. 171—184.
4. Курсанов А. Л., Сафонов В. И., Чаянова С. С., Сафонова М. В. Сравнительное изучение белков хлоропластов методом электрофореза в полиакриламидном геле. — В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., 1970, с. 143—153.
5. Мауер Г. Диск-электрофорез. М., 1971. 247 с.
6. Одицова М. С., Малеева А. А. Структура и функции хлоропластной ДНК. — В кн.: Нуклеиновые кислоты и биосинтез белка у растений. М., (в печати).
7. Прихоженко Э. Я., Белецкий Ю. Д. Электронномикроскопическое изучение структурных изменений пластид у некоторых пластидных пестролистных мутантов подсолнечника. — Цитология и генетика, 1979, т. 13, № 6, с. 467—470.
8. Разорителева Е. К., Белецкий Ю. Д., Жданов Ю. А. Генетическая привода мутаций подсолнечника, индуцированных N-нитрозо-N-метилмочевниной. I. Пестролистные формы. — Генетика, 1970, т. 6, № 8, с. 102—107.
9. Романова А. К., Русинова Н. Г., Васильева Н. Я., Корницкая В. М. Рибозе-фосфатизомеразы, фосфорилбулокиназа и рибулосодифосфаткарбоксилаза в экстрактах из клеток растений. — Биохимия, 1973, т. 38, № 3, с. 454—460.
10. Силаева А. М. Структура хлоропластов и факторы среды. Киев, 1978. 203 с.
11. Самсонова И. А., Беттгер Ф. Исследование мутабельности пластома. VI. Влияние акридиновых соединений на частоту обратных мутаций у пластомного мутанта томата P1—alpha—1. Генетика, 1978, т. XIV, № 11, с. 1928—1934.
12. Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. М., 1964. 260 с.
13. Юркевич В. В. Малый практикум по биохимии. М., 1979. 126 с.
14. Bishop D. H. L., Claybrook V. R., Spiegelman S. Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. — J. Mol. Biol., 1967, vol. 26, p. 373—387.
15. Borner Th., Knoth R., Hermann F., Hagemann R. Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. V. Das Fehlen von ribosomaler RNS in den Plastiden der Plastidmutante "Mrs Parker" von Pelargonium zonale. — Ail. Theoret. Appl. Genet., 1972, vol. 42, p. 3—11.
16. Borner Th. Struktur und Funktion des Chloroplastengenoms. — Biol. Zbl., 1980, Bd 99, S. 1—11.
17. Hagemann R. Genetics and molecular biology of plastids of higher plants. — In: Stadler Symp., vol. 11, Univ. of Missouri, Columbia, 1979, p. 91—116.
18. Hagemann R. Plastome mutants of higher plants in the study of chloroplast biogenesis. — In: Problems in general genetics. Proc. of the XIVth Intern. Congr. on Genetics, vol. 11, book 11. Moscow, 1980, p. 182—194.

19. *Loening U. E.* The fractionation on High-Molecular-Weight ribonucleic acid polyacrylamide-Gel Electrophoresis. — *Biochem. J.*, 1967, vol. 102, p. 251—257.
20. *Loening U. E., Ingle J.* Diversity of RNA components in green plants tissues. — *Nature*, 1967, vol. 215, p. 363—367.
21. *Schacterle I. R., Pollack R. I.* A simplified method for the quantitable assay of small amount of protein in biologic material. — *Anal. Biochem.*, 1973, vol. 51, N 2, p. 654—655.
22. *Chan P. H., Wildman S. G.* Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large subunit of fraction 1 protein. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, vol. 277, p. 677—680.
23. *Wettstein V. D., Poulsen C., Holder A. A.* Ribuloso-1,5-bisphosphate carboxylase as a nuclear and chloroplast marker. — In: *Problems in general genetics. Proc. of the XIVth Intern. Congr. on genetics. Moscow, 1980, vol. 11, book 11, p. 224—230.*