

- 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.

В частности, размеры митохондриального генома *N. tabacum* около 240 тыс. п. н. [5]. Электронно-микроскопический анализ выявил наличие нескольких классов кольцевых и линейных мтДНК, соотношение которых изменяется в процессе культивирования клеток *N. tabacum* [6—8]. В мтДНК *N. plumbaginifolia* присутствуют только линейные молекулы [9]. В ходе эволюции высших растений мтДНК, как и ДНК ядра, изменяется, что подтверждают проведенные исследования [10—19]. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение изменчивости митохондриального генома рода *Nicotiana*.

Характеристика изучаемых видов

Подрод Секция	Вид	Происхождение	Количество хромосом
<i>Rustica</i> <i>Paniculatae</i>	<i>N. glauca</i>	Аргентина	12
	<i>N. knighthiana</i>	Южная Америка	12
	<i>N. paniculata</i>	Перу	12
	<i>N. raimondii</i>	Южная Америка	12
	<i>N. benavidesii</i>	»	12
<i>Rusticae</i>	<i>N. rustica</i>	Перу	12
<i>Tabacum</i> <i>Tomentosae</i>	<i>N. otophora</i>	Южная Америка	12
	<i>N. seichelii</i>	»	12
	<i>N. tomentosa</i>	»	12
<i>Genuinae</i>	<i>N. tabacum</i>	»	24
<i>Petunoides</i> <i>Undulatae</i>	<i>N. undulata</i>	»	12
	<i>N. palmeri</i>	США, Мексика	12
<i>Trigonophyllae</i>	<i>N. trigonophylla</i>	»	12
	<i>N. plumbaginifolia</i>	Аргентина	10
<i>Alatae</i>	<i>N. sandere</i>	»	9
	<i>N. bonariensis</i>	»	9
	<i>N. forgetiana</i>	»	9
	<i>N. langsdorffii</i>	Уругвай	9
	<i>N. alata</i>	Аргентина, Перу	9
	<i>N. sylvestris</i>	Уругвай, Перу	12
	<i>N. noctiflora</i>	Южная Аргентина	12
<i>Noctiflorae</i>	<i>N. petunoides</i>	»	12
	<i>N. attenuata</i>	Чили	12
<i>Acuminatae</i>	<i>N. acuminata</i>	»	12
	<i>N. pauciflora</i>	Перу, Чили	12
<i>Repandae</i>	<i>N. repanda</i>	США, Мексика	24
<i>Nudicaules</i>	<i>N. nudicaulis</i>	Мексика	24
<i>Bigelovianae</i>	<i>N. bigelovii</i>	США, Мексика	24
<i>Suaveolens</i>	<i>N. eastii</i>	Австралия	—
	<i>N. suaveolens</i>	»	16
	<i>N. amplexicaulis</i>	»	18
	<i>N. gossei</i>	»	18
	<i>N. cavicola</i>	»	23
	<i>N. rosulata</i>	»	20
	<i>N. simulans</i>	»	20
	<i>N. ingulba</i>	»	20
	<i>N. maritima</i>	»	16
	<i>N. goodspedii</i>	»	20
	<i>N. excelsior</i>	»	19

**Материалы и методы.** МтДНК выделяли из листьев или цветов взрослых растений (таблица) общепринятым методом [20]. Очищенную таким способом мтДНК гидролизовали избытком рестриктаз *BamHI*, *PvuII*, *HindIII*, *PstI* (НПО «Фермент», Вильнюс). Рестриктивные фрагменты разделяли в 0,8 %-ной агарозе в трис-боратной буферной системе.

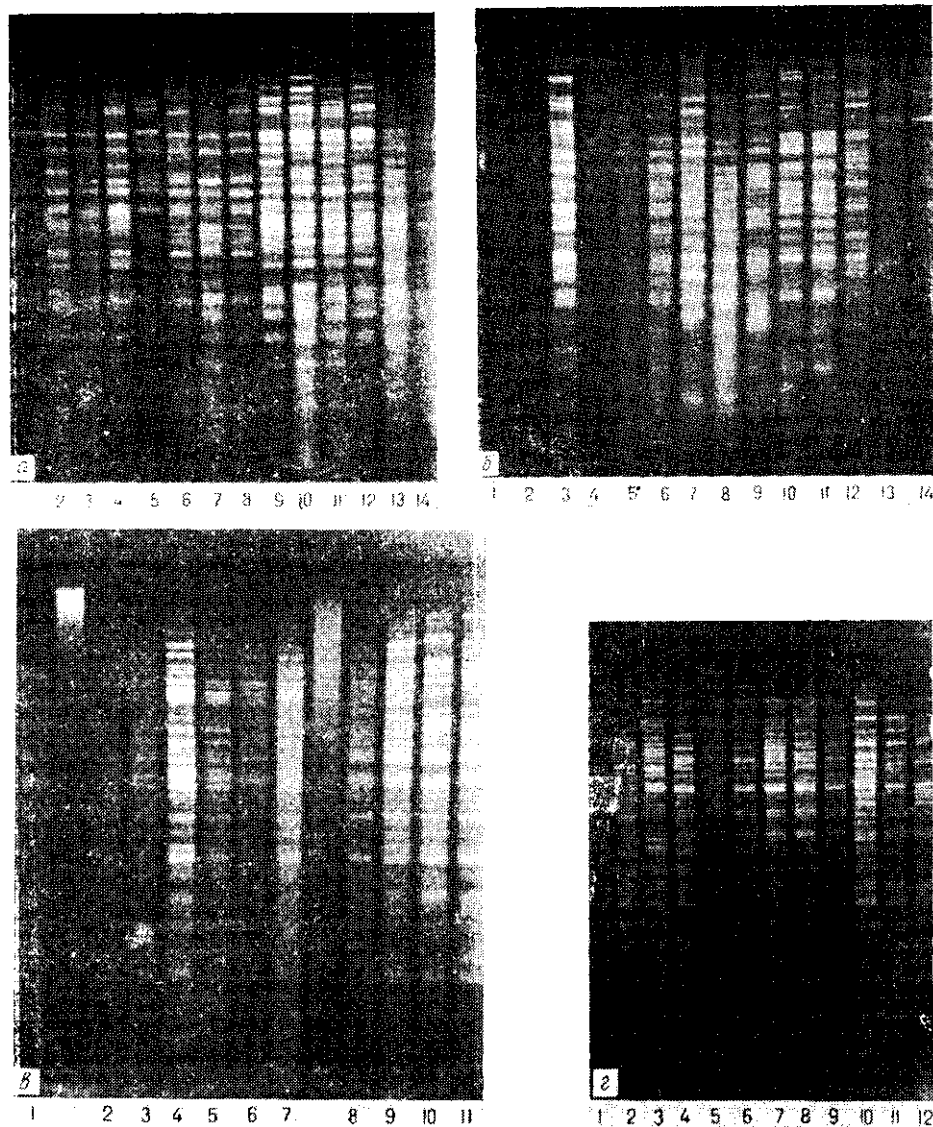
**Результаты и обсуждение.** Электрофореграммы фрагментов мтДНК видов *Nicotiana* представлены на рисунке: 1 — *N. tabacum*; 2 — *N. raimondii*; 3 — *N. paniculata*; 4 — *N. knighthiana*; 5 — *N. glauca*; 6 — *N. acuminata*; 7 — *N. pauciflora*; 8 — *N. attenuata*; 9 — *N. langsdorffii*; 10 — *N. forgetiana*; 11 — *N. bonariensis*; 12 — *N. sandere*; 13 —

*N. alata*; 14 — *N. plumbaginifolia*); 6 — BamHI (1 — *N. sylvestris*; 2 — *N. benavidesii*; 3 — *N. repanda*; 4 — *N. bigelovii*; 5 — *N. tomentosa*; 6 — *N. setchellii*; 7 — *N. otophora*; 8 — *N. undulata*; 9 — *N. rustica*; 10 — *N. petunoides*; 11 — *N. noctiflora*; 12 — *N. nudicaulis*; 13 — *N. trigonophylli*; 14 — *N. palmeri*); в — BamHI (1 — *N. tabacum*; 2 — *N. goodspedii*; 3 — *N. maritima*; 4 — *N. ingulba*; 5 — *N. simulans*; 6 — *N. rosulata*; 7 — *N. cavicola*; 8 — *N. gossei*; 9 — *N. amplexicaulis*; 10 — *N. eastii*; 11 — *N. suaveolens*); г — PvuII (1 — *N. tabacum*; 2 — *N. bigelovii*; 3 — *N. excelsior*; 4 — *N. goodspedii*; 5 — *N. maritima*; 6 — *N. ingulba*; 7 — *N. simulans*; 8 — *N. rosulata*; 9 — *N. cavicola*; 10 — *N. gossei*; 11 — *N. amplexicaulis*; 12 — *N. suaveolens*); д — HindIII (1 — *N. tabacum*; 2 — *N. excelsior*; 3 — *N. goodspedii*; 4 — *N. langsdorfii*; 5 — *N. forgetiana*; 6 — *N. bonariensis*; 7 — *N. sandere*; 8 — *N. ingulba*; 9 — *N. simulans*; 10 — *N. cavicola*; 11 — *N. gossei*; 12 — *N. amplexicaulis*; 13 — *N. eastii*; 14 — *N. suaveolens*). Из него видно, что *N. paniculata* и *N. rustica* имеют идентичные BamHI-рестриктные фрагменты (а — 3, б — 9). Согласно [21], вид *N. rustica* возник в результате естественной гибридизации между *N. paniculata* и *N. undulata*. Идентичность рестриктных фрагментов *N. rustica* и *N. paniculata* однозначно свидетельствует, что вид *N. paniculata* был материнской особью при гибридизации ее с *N. undulata* в процессе возникновения *N. rustica*. Полученный результат опровергает высказанное ранее нами предположение [22] о происхождении пластома *N. rustica* от *N. knighthiana*. МтДНК другого амфидиплоида *N. tabacum*, возникшего в результате естественной гибридизации между *N. tomentosiformis* и *N. sylvestris* [23], имела идентичные BamHI-рестриктные фрагменты с *N. sylvestris* [24]. Нами получен аналогичный результат (рисунок, а — 1; б — 1). Виды *N. trigonophylla* и *N. palmeri* также имеют одинаковые BamHI-рестриктные фрагменты (б — 13 и 14). Близкие виды *N. paniculata* и *N. knighthiana* (а — 3 и 4) различаются между собой только одним рестриктным фрагментом. Различия между *N. paniculata* и *N. knighthiana*, с одной стороны, и *N. glauca* — с другой (а — 5), более очевидно. МтДНК последнего вида существенно отличается от *N. raimondii* (а — 2). Анализ мтДНК видов секции *Paniculatae* показал, что мтДНК *N. glauca* имеет больше общих BamHI-фрагментов с мтДНК видов подрода *Petunoides*, чем видов подрода *Rustica* и *Tabacum*. Таким образом, цитоплазма *N. glauca* происходит от предшественников подрода *Petunoides*. Такой ход событий не исключают и другие исследователи [1, 26].

Анализ мтДНК видов секции *Tomentosae* (*N. tomentosa*, *N. setchellii*, *N. otophora*, рисунок, б — 5—7) обнаружил, что они или их предшественники не приняли участия в образовании настоящих 24-хромосомных видов рода по материнской линии.

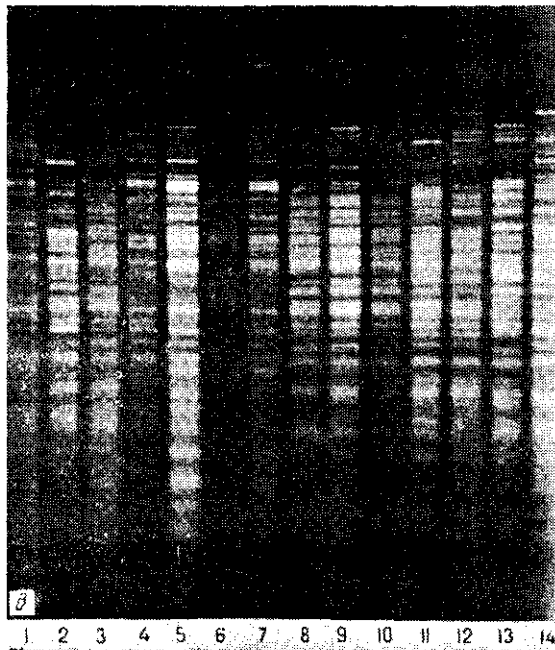
Виды *N. petunoides* и *N. noctiflora* схожи между собой, но не идентичны (рисунок, б — 10, 11). Среди секции *Acuminatae* два вида имеют идентичные рестриктные фрагменты *N. acuminata* и *N. attenuata* (рисунок, а — 6, 8). Третий вид *N. pauciflora* (а — 7) отличается от них несколькими рестриктными фрагментами. Согласно [1], предшественники видов секций *Acuminatae* и *Trigonophyllae* образовали секцию *Repandae*. МтДНК единственного представителя данной секции *N. repanda* (рисунок, б — 3) имеет больше общих фрагментов с видами секции *Trigonophyllae*. Не исключено, что материнской особью при возникновении вида *N. repanda* мог быть предшественник секции *Trigonophyllae*. В свою очередь [1] предшественники секции *Trigonophyllae* вместе с таковыми секции *Acuminatae* могли принимать участие в возникновении 24-хромосомного вида *N. nudicaulis* (рисунок, б — 12). Сравнение мтДНК настоящих видов этих секций не позволяет достоверно установить донора цитоплазмы *N. nudicaulis*.

Среди семи проанализированных видов секции *Alatae* не обнаружено растений с идентичным набором BamHI-рестриктных фрагментов (рисунок, а — 9—14; б — 1). Привлечение дополнительно рестриктаз



*PvuII*, *PstI* (результаты не представлены) и *HindIII* (рисунок, *б* — 4—7) также не позволило обнаружить в секции *Alatae* видов с идентичными рестриктными фрагментами. По мнению авторов [25], цитоплазма одного из настоящих видов этой секции *N. plumbaginifolia* или его предшественника является донором цитоплазмы не только некоторых других видов данной секции (*N. longiflora*, *N. alata*, *N. sylvestris*, *N. langsdorfii*), но и видов секций *Noctiflorae* и *Suaveolens*. Полученные нами результаты не позволяют однозначно подтвердить сделанное предположение. Исходя из наших данных, таким видом или его предшественником скорее всего может быть *N. langsdorfii*, так как у этого вида больше общих фрагментов с исследованными видами секций *Alatae*, *Suaveolens* и *Noctiflorae*, чем с видом *N. plumbaginifolia*.

На основе рестриктового анализа мтДНК виды секции *Suaveolens* разделены на две группы. МтДНК первой группы растений (*N. simulans*, *N. maritima*, *N. ingulba*, *N. rosulata*, *N. cavicola*, *N. goodspedii*) имеет похожие *BamHI*-рестриктные фрагменты (рисунок, *в* — 1—6) с видами секций *Suaveolens* и *Alatae*. Аналогичный результат получен при использовании рестриктаз *HindIII* (рисунок, *б* — 3, 8—10) или *PvuII* (рисунок, *г* — 4, 6—9). Это может свидетельствовать о том, что цито-



плазма данных видов происходит от общего предшественника и в процессе эволюции изменилась незначительно. Другие виды (*N. suaveolens*, *N. amplexicaulis*, *N. eastii*, *N. gossei*) имеют измененный тип мтДНК (рисунок, в — 8, 11; д — 11—14). Причиной этого могут быть высокая лабильность их мтДНК и то обстоятельство, что донором цитоплазмы второй группы растений был вид или его предшественник с иным типом мтДНК.

Таким образом, исследовав более половины видов рода *Nicotiana* и сопоставив результаты рестриктового анализа мтДНК с полученными ранее результатами [21, 22, 24, 25], можно сделать следующие выводы: во-

первых, *N. rustica* унаследовала цитоплазму от *N. paniculata*; во-вторых, настоящие виды секции *Tomentosae* или их предшественники не приняли участия по материнской линии в образовании настоящих 24-хромосомных видов; в-третьих, результаты рестриктового анализа, в основном, указывают на филогенетическое расхождение в пределах секции; в-четвертых, установленные филогенетические связи неполностью совпадают с таковыми, полученными на основе анализа хлоропластной ДНК.

#### Резюме

Рестриктні фрагменти мітохондріальної (мт) ДНК використані для встановлення філогенетичних зв'язків між 38 видами роду *Nicotiana*. В результаті показано, що вид *N. paniculata* є донором цитоплазми *N. rustica*. Дослідження організації мтДНК видів *N. rustica* та *N. paniculata*; *N. acuminata* та *N. attenuata*; *N. palmeri* та *N. trigonophylla* продемонструвало, що їх мтДНК стабільні. На основі аналізу мтДНК види секції *Suaveolens* можуть бути розділені на дві групи.

#### Summary

Mitochondrial DNA (mt DNA) restriction fragment patterns 38 *Nicotiana* species were used to study phylogenetic relationship. Results indicated that the *N. rustica* mt DNA was inherited from *N. paniculata*. Conservation in organization between mt DNA of *N. rustica* and *N. paniculata*, *N. acuminata* and *N. attenuata*, *N. palmeri* and *N. trigonophylla* provide evidence that the mt genome for these pairs of species is evolutionary stable. On the base of the mt DNA analysis the species of *Suaveolens* section can be divided into two groups.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Псарева Е. Н. О роде *Nicotiana* // Сб. науч.-исслед. работ ВИТИМ.— 1963.— № 153.— С. 10—153.
2. Chen K., Jahal S., Wildman S. D. Role of chloroplast and nuclear DNA genes during evolution of fraction I protein // Genet. and biogenesis of chloroplast and mitochondria.— Amsterdam: Elsevier, 1976.— P. 3—11.

3. *The evolution of fraction 1 protein during the origin of new species of Nicotiana!* S. D. Kung, K. Sakano, J. C. Gray et al. // *J. Mol. Evol.*—1975.—7, N 1.—P. 59—64.
4. *Wildman S. G. Polypeptide composition of Rubisco as an aid in studies of plant phylogeny* // *Protein and Nucl. Acids in Plant System.*—Berlin: Springer, 1983.—P. 182—190.
5. *Grayburn W. C., Bendich A. J. Variable abundance of a mitochondrial DNA fragment in cultured tobacco cells* // *Curr. Genet.*—1987.—12, N 4.—P. 257—261.
6. *Sparks R. B., Jr, Dale R. M. K. Characterization of H3-labelled supercoiled mitochondrial DNA from tobacco suspension culture cells* // *Mol. and Gen. Genet.*—1980.—180, N 2.—P. 351—355.
7. *Dale R. M. K. The structure and organization of the mitochondrial genome of plant tissue culture cells* // *J. Cell. Biol.*—1980.—87, N 2.—P. 185.
8. *Dale R. M. K., Wu M., Kiernan M. C. C. Analysis of four tobacco mitochondrial DNA size classes* // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 6.—P. 1673—1685.
9. *The mitochondrial genome of Nicotiana plumbaginifolia* / F. Manna, L. Del Giudice, D. R. Massardo et al. // *Curr. Genet.*—1985.—9, N 5.—P. 411—415.
10. *Внутривидовая изменчивость митохондриального генома у Triticum aestivum L.* / О. Г. Давиденко, И. К. Комарницкий, А. М. Самойлов, Ю. Ю. Глеба // *Докл. АН УССР. Сер. «Б».*—1989.—№ 4.—С. 58—61.
11. *Fantiarnau A., Hernandez-Yago J. Characterization of mitochondrial DNA in citrus* // *Plant Physiol.*—1982.—70, N 6.—P. 1678—1682.
12. *Ichikawa H., Tanno-Suenaga L., Imamura J. Mitochondrial genome diversity among cultivars of Daucus carota (ssp. sativus) and their wild relatives* // *Theor. and Appl. Genet.*—1989.—77, N 1.—P. 39—43.
13. *Intraspecific diversity of sugar beet (Beta vulgaris) mitochondrial DNA* / I. K. Komarnitsky, A. M. Samylov, V. P. Red'ko et al. // *Ibid.*—1990.—80, N 2.—P. 253—257.
14. *McClellan P. E., Hanson M. R. Mitochondrial DNA sequence divergence among Lycopersicon and related Solanum species* // *Genetics.*—1986.—112, N 3.—P. 649—667.
15. *Kemble R. J., Gunn R. E., Flavell R. B. Mitochondrial DNA variation in races of maize indigenous to Mexico* // *Theor. and Appl. Genet.*—1983.—65, N 2.—P. 129—144.
16. *Negrak V. I., Kaushik N. K. Structural variation in Vicia faba mitochondrial genome* // *Ibid.*—1988.—76, N 4.—P. 587—592.
17. *Ward B. L., Anderson R. S., Bendich A. J. The mitochondrial genome is large and variable in the family of plants (Cucurbitaceae)* // *Cell.*—1981.—25, N 7.—P. 793—803.
18. *Chowdhury M. K. U., Smith R. L. Mitochondrial DNA variation in pearl millet and related species* // *Theor. and Appl. Genet.*—1988.—76, N 1.—P. 25—32.
19. *Berthon F., Mathien C., Vedel F. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus Coffea L.* // *Ibid.*—1983.—65, N 1.—P. 77—84.
20. *Wilson A. J., Chourey P. S. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources* // *Plant Cell Report.*—1984.—3, N 6.—P. 237—239.
21. *Gray J. C. Serological reaction of fraction 1 proteins from interspecific hybrids in the genus Nicotiana* // *Plant System. Evol.*—1979.—129, N 3.—P. 177—183.
22. *Комарницкий И. К., Самойлов А. М., Глеба Ю. Ю. Рестрикционное картирование хлоропластной ДНК пяти видов Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 1.—С. 66—72.
23. *Bland M. M., Matzinger D. F., Levings C. S. Comparison of the mitochondrial genome of Nicotiana tabacum with its progenitor species* // *Theor. and Appl. Genet.*—1985.—69, N 5—6.—P. 535—541.
24. *Physical mapping of plastid DNA variation among eleven Nicotiana species* / Y. Salts, R. G. Hermann, N. Peleg et al. // *Ibid.*—1984.—68, N 1.—P. 1—14.
25. *Origin of Nicotiana tabacum detected by polypeptide composition of fraction 1 protein* / J. C. Gray, S. D. Kung, S. G. Wildman et al. // *Nature.*—1974.—252, N 2.—P. 226—227.
26. *Kung S. D., Zhu Y. S., Shen G. F. Nicotiana chloroplast genome. III. Chloroplast DNA evolution* // *Theor. and Appl. Genet.*—1982.—61, N 1.—P. 73—79.

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

Получено 14.01.91