

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

МОСКВА

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФОТОСИСТЕМ В ХЛОРОПЛАСТАХ *Chlamydomonas reinhardtii*

© 1998 г. В. Г. Ладыгин

Институт почвоведения и фотосинтеза Российской академии наук, Пушкино Московской обл.

Поступило в редакцию 15.10.97 г.

С помощью мутагенов (N-нитрозоэтилмочевины, УФ-С-излучения и гамма-радиации) были получены одинарные, двойные и тройные мутанты с нарушением синтеза одного, двух или трех пигмент-белковых комплексов фотосистем. Установлены спектральные формы хлорофилла и полосы излучения флуоресценции, характерные для каждого из 4-х нативных хлорофилл-белковых комплексов: реакционных центров ФС I, ФС II и связанных с ними светособирающих комплексов I и II (ССК I и ССК II) соответственно. Показано, что до 60–70% молекул хлорофилла входит в состав светособирающих комплексов и лишь 25–30% молекул хлорофилла *a* составляют антенну реакционных центров ФС I и ФС II. Изучены фотохимические свойства и проведена количественная оценка величины фотосинтетической единицы и числа реакционных центров ФС и обнаружено, что потеря светособирающих хлорофилл-белковых комплексов I и II не приводит к уменьшению числа реакционных центров ФС I и ФС II в расчете на хлоропласт. Установлено, что каждый из 4-х хлорофилл-белковых комплексов может автономно принимать участие в образовании мембранной системы хлоропластов. Если мембраны тилакоидов формировались за счет двух или только одного из хлорофилл-белковых комплексов, например, ФС II, то стехиометрическая плотность этих белковых частиц на 1 м² внутренней (EF) гидрофобной поверхности скола увеличивалась соответственно в 2 или 4 раза. Нами предложена принципиальная схема организации фотосистем зеленых водорослей и высших растений. Она основана на том, что хлорофилл *a*-белковый комплекс реакционного центра ФС II вместе со светособирающим хлорофилл *a/b*-белковым комплексом II (ССК II) входит в состав 160 Å частиц, локализованных на внутренней (EF) гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов в области гран, а хлорофилл *a*-белковый комплекс реакционного центра ФС I – вместе со светособирающим хлорофилл *a* (или *a/b*)-белковым комплексом I (ССК I) входит в состав 140 Å частиц, локализованных на внешней (PF) гидрофобной поверхности скола мембран межгранных участков тилакоидов.

Chlamydomonas reinhardtii – мутанты – фотосистемы I и II – хлорофилл-белковые комплексы – реакционные центры – спектральные формы хлорофилла – флуоресценция – мембраны тилакоидов – ультраструктура хлоропластов

Фотосинтез растений – важнейший процесс биосферы, раскрытие механизма которого во многом определит успех в решении вопроса пищевых и энергетических ресурсов на Земле. Для достижения этой цели необходимо детальное исследование функционирования и молекулярной организации уникальных по своей структуре и

функции фотосинтетических мембран хлоропластов и их генетического контроля.

Специфической особенностью фотосинтетических мембран хлоропластов является наличие в них пигментов и двух фотохимических систем: (ФС I) и (ФС II), структурно-функциональную основу которых составляют хлорофилл-белковые комплексы. До середины 70-х годов считалось, что в мембранах хлоропластов существуют два типа комплексов, различающихся по составу и соотношению хлорофиллов *a* и *b* [1], но уже тогда некоторые экспериментальные данные не укладывались в эти представления. Исследования пигмент-белковых комплексов [2, 3], спектров флуоресценции хлорофилла [4, 5], спектров поглощения и их вторых производных [6, 7], ультраструктуры хлоропластов [8–10] указывали на наличие в мембранах хлоропластов других комплексов, не связанных непосредственно с

Сокращения: РЦ – реакционный центр; CP I и CP II – хлорофилл *a*-белковые комплексы реакционных центров ФС I или ФС II; ССК I – светособирающий хлорофилл *a*- (или *a/b*)-белковый комплекс I, ассоциированный с комплексом ФС I; ССК II – светособирающий хлорофилл *a/b*-белковый комплекс II, связанный с комплексом ФС II; ЭПР – электронно-парамагнитный резонанс; НЭМ – N-нитрозоэтилмочевина; УФ-С – ультрафиолетовое излучение (область С) с полосой поглощения 200–280 нм; ЛД₉₀ – летальная доза 90%.

Адрес для корреспонденции: Ладыгин Владимир Георгиевич. 142292 Пушкино, Московской обл., Институт почвоведения и фотосинтеза РАН.

реакционными центрами фотосистем. Отсутствие ясности в идентификации и составе хлорофилл-белковых комплексов фотосистем требовало систематического и всестороннего изучения этой проблемы.

Ранее большинство исследований проводилось на выделенных хлоропластах и мембранах с использованием детергентов, ингибиторов синтеза белка и антибиотиков. При таких подходах не исключалась возможность получения неоднозначных результатов, артефактов и даже свойств, не характерных для нативных систем. Важные результаты были получены при изучении метаболизма углерода и цепей биосинтеза пигментов методом меченых атомов, но ограничением такого подхода являлась сложность исследования быстро протекающих процессов и анализа промежуточных продуктов из-за того, что часто их трудно получить в достаточном количестве для идентификации и детального изучения. Значимость и актуальность проблемы требовали поиска новых путей и объектов для анализа нативных или близких к нативному состоянию фотосинтетических мембран.

Таким целенаправленным подходом к изучению структуры и функции мембран хлоропластов могло служить создание генетических коллекций пигментных и нефотосинтезирующих мутантов с нарушением формирования одного, двух или трех хлорофилл-белковых комплексов и их различным сочетанием непосредственно в хлоропластах целых клеток. Используя метод экспериментального мутагенеза, можно производить прижизненную, поэтапную “разборку” сложных систем до индивидуальных составляющих, при этом сохраняя оставшиеся компоненты клетки в нативном состоянии в оптимальных миксотрофных условиях роста. В зависимости от задачи исследования в каждом конкретном случае можно отобрать серию строго определенных мутантов, с помощью которых выделить любые промежуточные продукты биосинтетического процесса и изучить их состав и свойства. В сложных системах, например, при изучении фотосистем, можно блокировать образование отдельных компонентов и детально проанализировать оставшиеся индивидуальные составляющие, существенно не нарушая при этом другие компоненты в клетке. Именно такой методический подход был использован нами в данной работе.

Цель работы состояла в том, чтобы показать, что в структурно-функциональной организации фотосистем хлоропластов принимают участие 4 типа пигмент-белковых комплексов, имеющих характерные индивидуальные свойства и генетически независимо контролируемых.

Для достижения этой цели мы использовали, химические и физические мутагены, чтобы инду-

цировать мутации, блокирующие синтез отдельных белков фотосистем и образование нативных хлорофилл-белковых комплексов и в конечном счете методом ступенчатого мутагенеза получить 4 типа тройных мутантов, два из которых содержали бы комплексы реакционных центров (РЦ) ФС I или ФС II, а два – светособирающие комплексы (ССК) I или II. Учитывая специфичность генетически контролируемого состава белков, несущих хлорофилл, установить с помощью мутантов закономерности распределения спектральных форм хлорофилла и их флуоресцентные свойства, а также охарактеризовать фотохимическую активность и структурную организацию фотосистем и их пространственную локализацию в мембранах тилакоидов *Chlamydomonas reinhardtii*.

МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования в работе использовали клетки дикого типа K(+) *Chlamydomonas reinhardtii* и одинарные, двойные и тройные мутанты из коллекции Института почвоведения и фотосинтеза РАН [11]. В зависимости от задачи исследования брали наиболее удобные для ее решения пигментные либо нефотосинтезирующие мутанты: одинарные А-66 без комплекса РЦ ФС I, А-90 без комплекса РЦ ФС II и их гибрид А-66-90 и двойной мутант ВФ-5 без комплексов РЦ обеих ФС; либо пигментные мутанты: одинарные С-10 и С-42, не содержащие светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса I (ССК I), и С-48 без хлорофилла *b*, не содержащий светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса II (ССК II), и полученный от него двойной мутант СС-107, не содержащий обоих светособирающих комплексов ССК I и ССК II. Там же, где требовалось изучить свойства индивидуальных комплексов, мы брали тройные мутанты, или полученные от СС-107, содержащие чистые хлорофилл *a*-белковые комплексы РЦ ФС I (мутанты: АСС-11, АСС-14, АСС-42) или РЦ ФС-II (АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238), хлорофилл *a/b*-белковые комплексы II (ССК II) мутант ВФ-5-16, или I (ССК I) – мутант А-66-90-1 [11].

Мы использовали методы анализа летального и мутагенного действия УФ-С-лучей [12, 13], γ -излучения [14, 15, с. 265] и N-нитрозоэтилмочевины (НЭМ) [12, 15, с. 291]. Специфика действия НЭМ состоит в индукции большого числа пигментных мутантов [12]. Ультрафиолетовый свет является единственным неионизирующим излучением, способным к повышению частоты различных типов мутаций, преимущественно точковых ядерных [15, с. 280]. Ионизирующее γ -излучение индуцирует все типы мутаций как ядерных, так и хлоропластных генов [15, с. 268; 16]. С помощью этих мутагенов нами были получены все типы мутантов, необходимые для данного исследования.

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в 100%-ном ацетоне [12]. Биохимический анализ хлорофилл-белковых комплексов проводили методом гель-электрофореза [17–19]. Спектральные формы хлорофилла [6, 7] и полосы излучения флуоресценции [5, 20, 21] анализировали методом второй производной спектров поглощения и флуоресценции хлорофилла целых клеток при температуре жидкого азота (-196°C).

Фотосинтетическую активность мутантов характеризовали по способности к выделению O_2 [22], а величину фотосинтетической единицы и число реакционных центров рассчитывали по сигналам ЭПР I и ЭПР II [23] и светоиндуцированным изменениям поглощения П680, феофитина и П 700 [24].

Электронно-микроскопическую структуру хлоропластов изучали на тонких срезах фиксированных клеток [25] и сколах мембран тилакоидов целых клеток, замороженных при минус 140°C в жидком пропане [10, 26].

На рисунках представлены средние арифметические величины 3–6 независимых опытов, а в таблицах – средние данные и их стандартные ошибки для 3-х повторных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие мутагенных факторов

В качестве мутагенов мы использовали химические (N-нитрозэтилмочевину – НЭМ), УФ-лучи и γ -излучение. Прежде чем приступить к получению мутантов любого из объектов, необходимо проанализировать выживаемость и выход мутаций после действия мутагенов и подобрать оптимальные дозы.

Вегетативные клетки *Chlamydomonas* гаплоидны, поэтому после воздействия мутагенов мы ожидали, что кривые выживаемости доза–эффект будут экспоненциальными. Однако, полученные нами данные для всех трех мутагенов показали их сигмоидный характер (рис. 1а). Этот факт можно объяснить двумя причинами: 1) работой репараторной системы, когда физиологические и генетические изменения при малых дозах элиминировались клеткой, и 2) гетерогенностью популяции клеток, различающихся по устойчивости, в частности тех, которые к моменту воздействия мутагена прошли стадию репликации ДНК и содержали удвоенной по крайней мере ту часть генома, которая имела прямое отношение к выживаемости.

При анализе выхода мутаций от дозы было установлено (рис. 1б), что для N-нитрозэтилмочевины (НЭМ) и ультрафиолетового излучения (УФ-С-лучей) частота мутаций повышалась с увеличением дозы, но до определенного предела, выше которого заметного отклонения в сторону

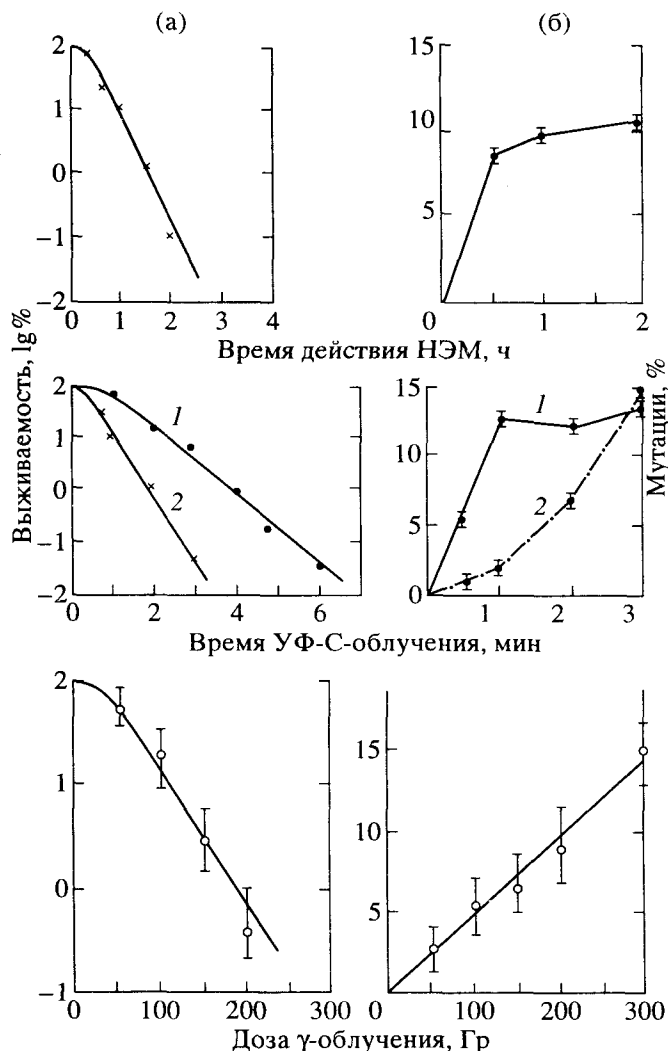


Рис. 1. Зависимость выживаемости (а) и выхода мутаций (б) от дозы после воздействия N-нитрозэтилмочевины ($C = 0.005 \text{ M}$), УФ-С-излучения ($50 \text{ эрг}/(\text{мм}^2 \text{ c})$) и γ -радиации Cs^{137} на клетки дикого типа К(+). 1 – УФ-С-излучение без фотореактивации, 2 – с фотореактивацией.

увеличения не наблюдали. Поэтому для этих мутагенов оптимальной дозой для получения мутантов мы выбрали LD_{90} , что соответствовало дозам: для НЭМ 1 ч ($C = 0.005 \text{ M}$) и УФ-С-лучей 1 мин в варианте без фотореактивации и 3 мин в варианте с фотореактивацией. Для γ -радиации выход мутаций имел экспоненциальную зависимость, поэтому для получения мутантов оптимальной дозой мы считали LD_{99} (200 Гр), дающей высокий процент выхода мутаций (10–15%) и статистически достаточное для анализа число выживших клеток (1–2%).

Получение мутантов. Наиболее важным моментом при отборе мутантов являлся выбор кри-

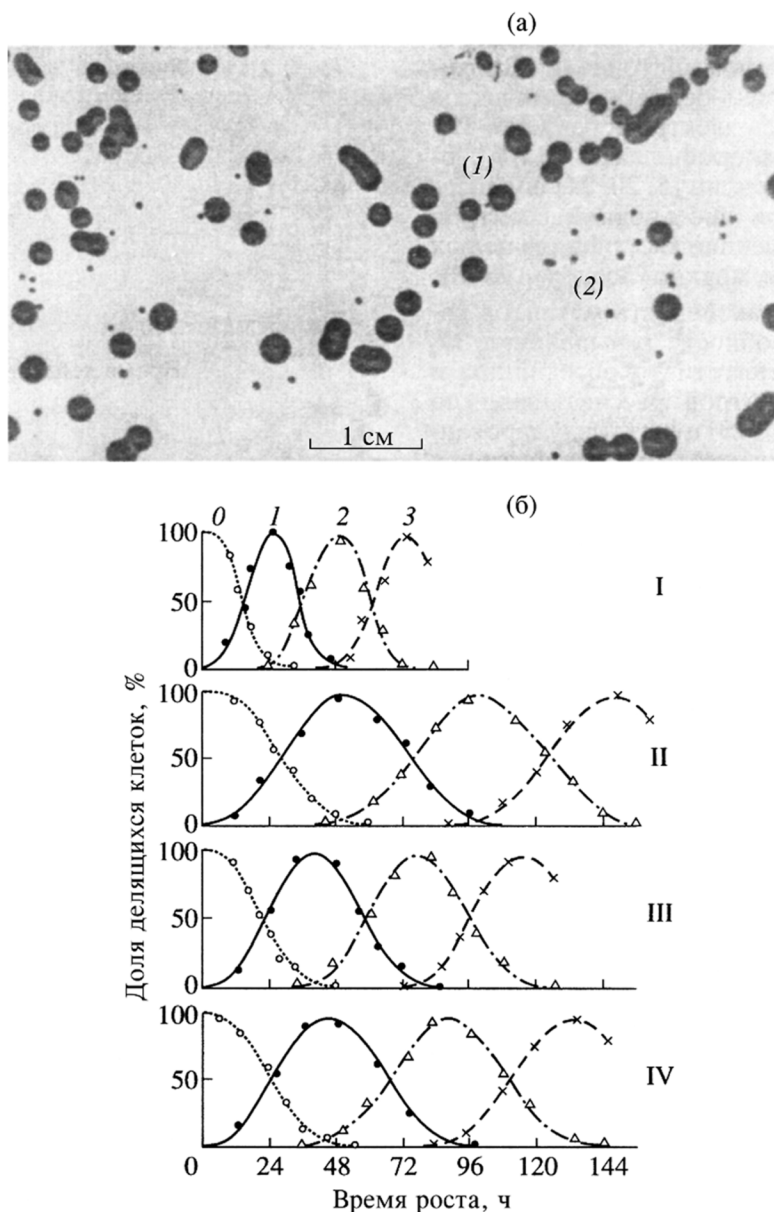


Рис. 2. Размеры колоний (а) и скорость деления клеток дикого типа у различных мутантов (б).

а – нормальные колонии клеток дикого типа К(+), (1) и карликовые колонии (2) нефотосинтезирующих мутантов. б – последовательное деления клеток дикого типа К(+), (I) и мутантов: А-66 без ФС I (II), А-90 без ФС II (III) и гибрида А-66-90 без обеих фотосистем (IV), объясняющие появление мелких (карликовых) колоний мутантов в результате увеличения в 2–2,5 раза времени, необходимого на одно клеточное деление в сравнении с контрольным. Продолжительность одного клеточного цикла определяли по времени между максимумами двух последовательных делений клеток.

0 – единичные клетки; 1 – первое (4 клетки), 2 – второе (16 клеток) и 3 – третье (64 клетки) деления клеток. Кривые построены на основании результатов 3–4 независимых опытов. Процент делящихся клеток определяли через каждые 2 ч роста на ацетатной агаризованной среде, просчитывая 500–1000 клеток.

териев селекции: окраска, размеры, морфология колоний, ростовые признаки и т.д. Мы установили, что после воздействия мутагенов появлялось большое число (рис. 2а) мелких (карликовых) колоний [12, 16]. Природа их очень разнообразна. Часть мелких колоний, клетки которых при последующих пересевах восстанавливали скорость размножения до контрольной, не являлись мутан-

тами. Остальные карликовые колонии (рис. 2б), клетки которых в сравнении с контрольными (рис. 2б, I) требовали в 2–2,5 раза больше времени (рис. 2б, II–IV) на одно клеточное деление при любых условиях выращивания, очень часто были нефотосинтезирующими ацетат-зависимыми мутантами (А-мутанты) [16]. Часть мутантов обнаруживала потребность в аминокислотах или вита-

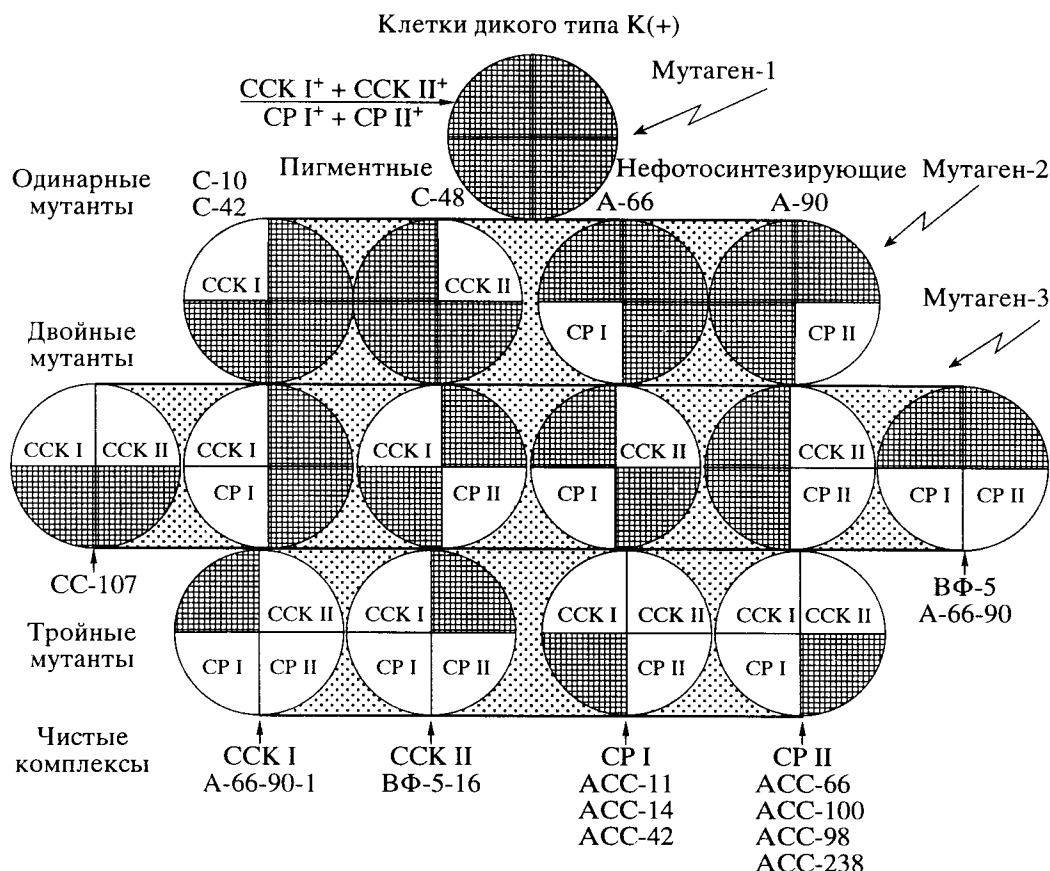


Рис. 3. Схема получения одинарных, двойных и тройных мутантов с нарушениями одного, двух или трех хлорофилл-белковых комплексов хлоропластов методом ступенчатого мутагенеза.

Белый сектор – комплексы, утраченные в результате мутации; заштрихованный – сохранившиеся. Внизу схемы – чистые комплексы, сохранившиеся у тройных мутантов и обозначения этих мутантов. СР I, СР II – хлорофилл-белковые комплексы ФС I и ФС II (ср. с рис. 4).

минах, что давало основание считать их ауксотрофами. Крапчатые колонии давали высокий процент реверсий (нестабильные) и, так же как и морфологические колонии (с неровной, шероховатой поверхностью), были немногочисленными. Наибольшую и легко выявляемую группу составляли пигментные мутанты. Они подразделялись на группы: белые (Б-мутанты), не содержащие пигментов; желтые (Ж-мутанты), хлорофилл-дефицитные, накапливающие только каротиноиды, светло-зеленые (С-мутанты), с уменьшенным содержанием пигментов; темно-зеленые (Т-мутанты), с увеличенным накоплением пигментов.

Мы провели анализ более 150 пигментных и нефотосинтезирующих мутантов и установили, что с помощью вышеперечисленных мутагенов можно получить только 4 типа мутантов с генетическим нарушением синтеза отдельных компонентов хлорофилл-белковых комплексов [17, 21]. Автономное существование в хлоропластах 4-х типов хлорофилл-белковых комплексов позволило нам получить их в чистом виде в живых

клетках путем ступенчатого мутагенеза, последовательной индукцией одинарных, двойных и тройных мутантов (рис. 3).

Биохимический состав и спектральные свойства нативных хлорофилл-белковых комплексов

Содержание пигментов. Учитывая, что специфичность белков-носителей в комплексах играет решающую роль в локализации хлорофилла, можно было ожидать потерю в каждом конкретном мутанте именно той части хлорофилла, которая была связана с утраченным в результате мутации комплексом (рис. 3). Исследования, проведенные нами [6, 17], полностью подтвердили эту гипотезу и позволили установить, что потеря любого хлорофилл-белкового комплекса у мутантов сопровождалась уменьшением определенного количества (табл. 1) пигментов в расчете на клетку с характерными спектральными, биохимическими и фотохимическими свойствами [6, 18, 21–23]. Так, у мутанта С-48 и всех хлорофилл *b*-

Таблица 1. Содержание пигментов (хлорофилла *a** и каротиноидов) в клетках дикого типа и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*

Штаммы	Хлорофилл <i>a</i>	Каротиноиды	Хлорофилл <i>a</i>	Каротиноиды	Хлорофилл <i>a</i> Каротиноиды
	мкг/10 ⁷ клеток		мг/г сырой массы		
K(+)*	22.3 ± 0.7	6.5 ± 0.6	6.76 ± 0.28	2.09 ± 0.19	3.2–3.4
C-48	15.2 ± 0.6	4.5 ± 0.5	5.31 ± 0.36	1.29 ± 0.27	3.4–4.1
CC-107	9.2 ± 0.8	3.4 ± 0.3	2.16 ± 0.47	0.84 ± 0.14	2.6–2.7
ACC-11	3.6 ± 0.7	3.2 ± 0.6	0.62 ± 0.09	0.55 ± 0.11	1.1–1.2
ACC-14	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	0.55 ± 0.07	0.50 ± 0.08	1.1–1.5
ACC-42	3.3 ± 0.4	2.7 ± 0.5	0.57 ± 0.06	0.47 ± 0.09	1.1–1.3
ACC-66	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.5	0.35 ± 0.08	0.32 ± 0.02	1.0–1.1
ACC-98	2.3 ± 0.5	1.9 ± 0.3	0.40 ± 0.04	0.27 ± 0.09	1.2–1.5
ACC-100	2.8 ± 0.4	2.1 ± 0.5	0.45 ± 0.11	0.28 ± 0.05	1.3–1.6
ACC-238	2.3 ± 0.3	1.7 ± 0.4	0.42 ± 0.06	0.28 ± 0.06	1.4–1.5

Примечание. С-48 – одинарный хлорофилл *b*-дефицитный мутант; СС-107 – двойной мутант, без светособирающих комплексов, содержащий только ФС I и ФС II; АСС-11, АСС-14, АСС-42 – тройные мутанты, содержащие только комплексы РЦ ФС I; АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238 – тройные мутанты, содержащие только комплексы РЦ ФС II.

* K(+) – штамм дикого типа 137C mt+ (дополнительно содержит хлорофилл *b*: 9.8 мкг/10⁷ клеток или 2.54 мг/г сырой массы).

дефицитных мутантов [27, 28] не формировался светособирающий хлорофилл *a/b*-белковый комплекс II (ССК II) и терялся весь хлорофилл *b* [17]. При этом доля связанного с этим комплексом и соответственно утраченного хлорофилла *a* составляла около 30% от содержания его в клетках дикого типа [23]. Одинарные мутанты С-10 и С-42 (рис. 3), утратившие светособирающий хлорофилл-белковый комплекс I (ССК I), накапливали на 20–30% меньше пигментов, чем клетки дикого типа [21, 23]. А двойной мутант СС-107, не содержащий обоих светособирающих комплексов, накапливал хлорофилла на 60–70% меньше, чем в контроле [21, 23]. Эти данные давали основание утверждать, что именно такое количество хлорофиллов (в том числе весь хлорофилл *b*) входит в состав светособирающих комплексов.

Исследования одинарных нефотосинтезирующих мутантов А-66 и А-90 (рис. 3), утративших хлорофилл *a*-белковые комплексы реакционных центров ФС I (СР I) или ФС II (СР II) [6], а также тройных мутантов, содержащих в чистом виде только один из этих комплексов, позволили установить (табл. 1), что на долю комплекса РЦ ФС I (мутанты АСС-11, АСС-14 и АСС-42) приходится 15–20% хлорофилла *a*, а на долю комплекса РЦ ФС II (мутанты АСС-66, АСС-98, АСС-100 и АСС-238) – 10–15% хлорофилла *a* от общего его содержания в клетках дикого типа К(+) [21, 23].

Изменения в содержании каротиноидов были менее значительными [24, 29] и, по-видимому, не являлись прямым следствием мутаций. Вероятно, они были обусловлены либо плейотропным действием генов, либо взаимозависимым синтезом пигментов и деструктивными изменениями мемб-

ран хлоропластов в результате потери хлорофилла пигмент-белковых комплексов [23–26].

Идентификация хлорофилл-белковых комплексов. Для установления прямой связи изменений в содержании пигментов и идентификации принадлежности отдельных хлорофиллсодержащих полос в геле к определенным комплексам необходимо было провести анализ мембран хлоропластов мутантов методом гель-электрофореза. Лучше это было сделать исследуя двойные мутанты (рис. 4), содержащие только комплексы РЦ ФС I и ФС II (СС-107) или только ССК I и II (А-66-90) в сравнении с клетками дикого типа К(+). Мы установили, что в геле можно выявить по одной полосе хлорофилл *a*-белковых комплексов реакционного центра ФС I (СР I) или реакционного центра ФС II (СР II) и три хлорофиллсодержащие полосы (LH₁, LH₂, LH₃), принадлежащие светособирающему хлорофилл *a/b*-белковому комплексу II (ССК II), и две полосы (LH₀ и LH_x), принадлежащие светособирающему хлорофилл *a* (или *a/b*)-белковому комплексу I (ССК I), а также одну полосу свободных пигментов (FP), содержащую не связанные с белком хлорофилл *a* и каротиноиды [17].

Полипептидный состав индивидуальных комплексов

Мы исследовали состав полипептидов мутантов, не способных к синтезу определенных пигмент-белковых комплексов [18, 19]. На основании всестороннего анализа различных мутантов было показано [18, 19], что у *Chlamydomonas*, как и у высших растений [30–32], светособирающий

хлорофилл *a/b*-белковый комплекс II (ССК II) содержит три основных полипептида с мол. м. 26, 28 и 31 кД. В состав светособирающего хлорофилл-белкового комплекса I (ССК I) входят также три полипептида с мол. м. 23, 25 и 34 кД [18].

Основными полипептидами хлорофилл *a*-белкового комплекса ФС I являются хлорофиллсодержащие полипептиды 65 и 68 кД, образующие внутреннюю антенну реакционного центра ФС I. Важным условием для формирования и агрегации нативного комплекса ФС I является наличие полипептида 19 кД (Fe-S-белка). У мутантов, утративших этот низкомолекулярный полипептид, весь комплекс ФС I не формируется [18].

Аналогичным образом происходит формирование и агрегация хлорофилл *a*-белкового комплекса РЦ ФС II. В этом комплексе основными хлорофиллсодержащими белками являются высокомолекулярные полипептиды 47 и 51 кД (CP 43, CP 47), образующие внутреннюю антенну реакционного центра ФС II. Однако для нормального формирования комплекса, включающего помимо указанных выше полипептидов и гербицидсвязывающий белок Д1 (32 кД), необходим еще Д2-белок (30 кД). Если у мутантов нарушается синтез полипептида 30 кД, то у них не происходит образование и агрегация всего комплекса ФС II [18]. Более детально охарактеризован полипептидный состав у высших растений [30–34].

Спектральные формы хлорофилла нативных комплексов. Все высшие растения и зеленые водоросли имеют два типа молекул хлорофиллов *a* и *b*. В экстракте каждый из этих пигментов имеет только один максимум поглощения, например, в ацетоне при 662 и 644 нм соответственно. Не выявляются в экстракте другие максимумы и при использовании производной спектрофотометрии [7]. В то же время в хлоропластах живых клеток известны две формы хлорофилла *b* и, по-видимому, семь основных форм хлорофилла *a* [6, 7]. Одной из главных причин, изменяющих спектральные свойства молекулы хлорофилла *in vivo*, является его взаимодействие со специфическими белками мембран хлоропластов, генетическое нарушение которых ведет к потере активности реакционных центров ФС I или ФС II в зависимости от того, какой из белков утрачен в результате мутации. Проведенные нами исследования мутантов: 1) А-66 с неактивной ФС I, 2) А-90 с неактивной ФС II и 3) А-66-90 с неактивными обеими фотосистемами позволили установить различные спектральные формы хлорофилла в нативных пигмент-белковых комплексах мембран хлоропластов [6, 7, 21], чего с использованием других методов сделать не удавалось.

Использование целых клеток мутантов позволило установить (рис. 5), что формы хлорофилла *a* с максимумами поглощения при 689, 698 и 703

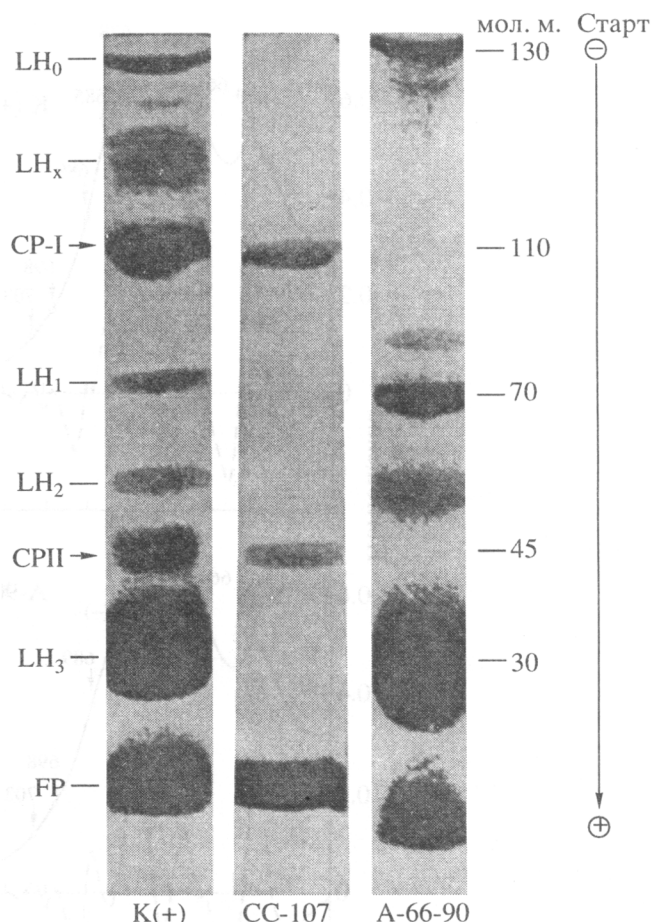


Рис. 4. Гель-электрофорез хлорофилл-белковых комплексов мембран хлоропластов клеток дикого типа K(+) и двойных мутантов: CC-107, содержащего только комплексы РЦ ФС I (CP I) и ФС II (CP II), и гибрида А-66-90, содержащего только светособирающие комплексы: ССК I ($LH_0 + LH_x$) и ССК II ($LH_1 + LH_2 + LH_3$).

Цифрами показаны величины молекулярных масс (мол. м.), а стрелкой – направление гель-электрофореза. У мутанта А-66-90 полоса LH_x выявляется над полосой LH_1 в результате частичного нарушения структуры LH_x .

нм входят только в состав хлорофилл *a*-белкового комплекса ФС I и выполняют функции внутренней антенны ее реакционного центра П700. Утрата комплекса ФС I (мутант А-66) приводит к исчезновению этих полос поглощения в спектре.

Формы хлорофилла *a* 661, 673, 685 нм с основным длинноволновым максимумом при 685 нм [7] входят в состав хлорофилл *a*-белкового комплекса ФС II. Мутант А-90, утративший этот комплекс, теряет соответствующие формы хлорофилла и выполняет функции внутренней антенны ее реакционного центра П680. Сохранение у гибридного штамма А-66-90 с неактивными обеими фотосистемами форм хлорофилла *b* при 644 и 649 нм и форм хлорофилла *a* с максимумами по-

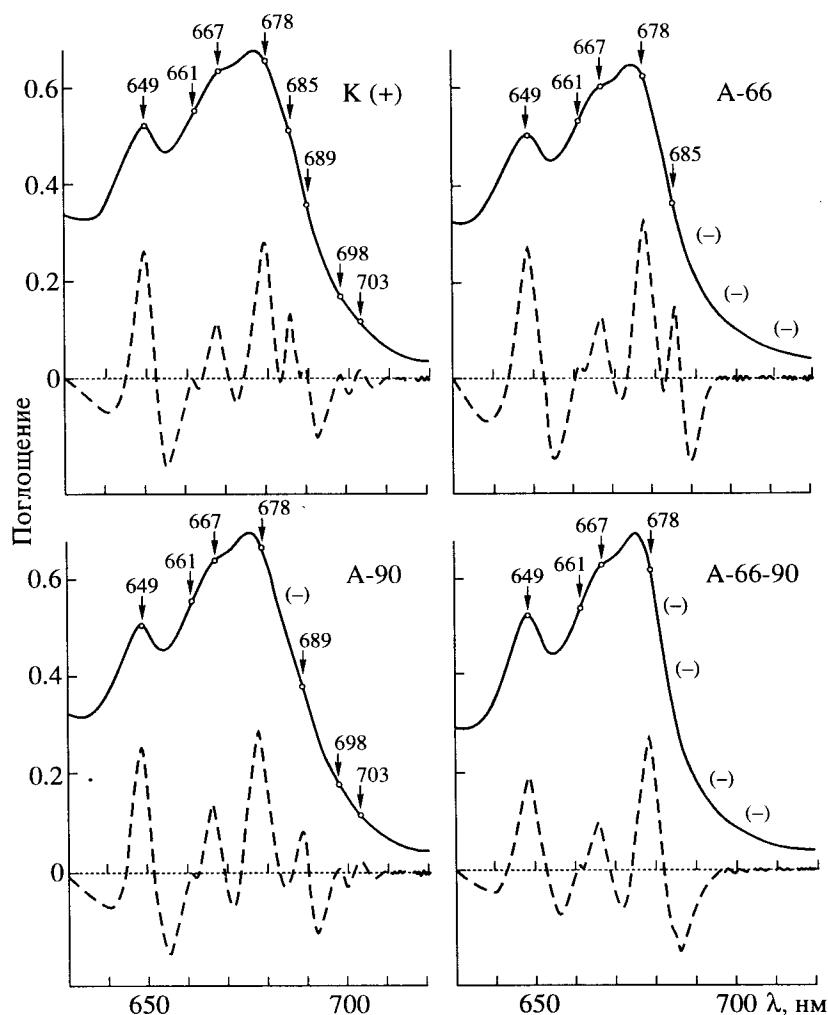


Рис. 5. Спектры поглощения хлорофилла (А – сплошная линия) и их вторые производные ($\Delta^2 A / \Delta \lambda^2$ – пунктирная линия) при температуре -196°C клеток дикого типа К(+) и мутантов: без ФС I (А-66), без ФС II (А-90) и гибрида без обеих фотосистем (А-66-90). Спектры второй производной для удобства представлены максимумами вверх.

глощения при 661, 667 и 678 нм указывало на принадлежность этих форм хлорофилла к светособиравшим комплексам [6, 21, 23].

Для подтверждения этих выводов мы провели исследование на полученных нами тройных мутантах. Впервые на целых клетках удалось установить конкретные спектральные формы хлорофиллов этих комплексов: а) для нативного светособиравшего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса II (ССК II) 649, 661, 667, 676 нм и б) для нативного светособиравшего хлорофилл *a* (или *a/b*)-белкового комплекса I (ССК I) 644, 661, 663, 671, 681 нм (рис. 6).

Флуоресценция хлорофилла нативных комплексов. Известно, что клетки дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* имеют три характерные полосы в спектре излучения флуоресценции хлорофилла при -196°C с максимумами при 686, 697 и 715 нм и слабо выраженный максимум в об-

ласти 678–680 нм (рис. 7). Двойные мутанты (СС-107), содержащие только хлорофилл *a*-белковые комплексы РЦ ФС I и РЦ ФС II, имели три четких максимума при 686, 697 и 720 нм. В то же время клетки гибрида А-66-90, содержащие только светособиравющие хлорофилл *a/b*-белковые комплексы I (ССК I) и II (ССК II), имеют два хорошо выраженных максимума при 681 и 707 нм. Эти факты давали основание утверждать, что каждому из нативных хлорофилл-белковых комплексов свойственны строго определенные полосы излучения флуоресценции хлорофилла.

Для получения прямого ответа на вопрос о том, какие полосы флуоресценции принадлежат каждому из комплексов, мы изучили тройные мутанты, содержащие в нативном состоянии только по одному из хлорофилл-белковых комплексов. Исследование их спектров флуоресценции однозначно показало, что в нативном состоянии ком-

Таблица 2. Характеристика функционального состояния электронтранспортной цепи хлоропластов клеток дикого типа и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* по их способности к фотосинтетическому выделению кислорода [22]

Штаммы (мутанты)	Импульсное освещение		Непрерывное освещение		Выход O ₂ на 1-ю и 2-ю вспышки (V ₁ , V ₂)	Темновой выброс O ₂ после освещения (V _{темн})
	осцилляции выделения O ₂ (V _{макс} -V _{мин})	стационарный уровень O ₂ (V _{стац})	первичный выброс O ₂ (V _{макс})	стационарное выделение O ₂ (V _{стац})		
K(+)*	++	++	++	+++	—	—
C-48	++	++	+++	++	+	+
CC-107	+	+	++	++	+	+
ACC-11	—	—	—	—	—	—
ACC-14	—	—	—	—	—	—
ACC-42	—	—	—	—	—	—
ACC-66	++	++	+++	—	—	—
ACC-98	++	++	+++	—	—	—
ACC-100	++	++	+++	—	—	—
ACC-238	+	+	+++	+	—	—

Примечание. Знаком (+) показано наличие слабой, нормальной (++) и высокой (+++) активности по данному показателю, а знаком (—) — ее отсутствие. (V_{макс}-V_{мин}) — показатели работы ферментной системы формирования O₂; V_{стац} — показатель работы системы окисления H₂O и реакционного центра ФС II; V_{макс} — показатель работы реакционного центра ФС I и системы фиксации CO₂; V₁, V₂ — критерии образования O₂ на первую и вторую вспышки света; V_{темн} — темновое выделение O₂ при дисмутации H₂O₂.

плексу РЦ ФС I принадлежит полоса излучения при 720 нм (ACC-14), а комплексу РЦ ФС II принадлежат две полосы излучения при 686 и 697 нм (ACC-66), светособирающему хлорофиллу *a/b*-белковому комплексу II (ССК II) — полоса при 681 нм (ВФ-5-16), а светособирающему хлорофиллу *a* (или *a/b*)-белковому комплексу I (ССК I) — полоса при 707 нм. Детальный анализ мутантов, у которых генетически блокировано формирование одного, двух или трех пигмент-белковых комплексов, позволил установить для *Chlamydomonas* наличие двух длинноволновых полос излучения при 707 и 720 нм, обуславливающих суммарную длинноволновую полосу флуоресценции клеток дикого типа при 715 нм [5, 21, 23].

Таким образом, проведенные нами биохимические и спектральные исследования одинарных, двойных, тройных нефотосинтезирующих мутантов и гибридного штамма в сравнении с клетками дикого типа привели к заключению о существовании в хлоропластах 4-х типов различных хлорофилл-белковых комплексов: двух, принадлежащих реакционным центрам ФС I (СР I) и ФС II (СР II), и двух, связанных с ними, светособирающих комплексов I (ССК I) и II (ССК II) (рис. 8). Важно отметить, что установленная нами универсальная закономерность распределения спектральных форм хлорофилла для *Chlamydomonas* [21] была подтверждена нами на морских многоклеточных зеленых, бурых и красных водорослях, на эвглеме, хлорелле и на высших растениях как хвойных, так и лиственных С₄- и С₃-растениях,

причем как при генетической блокировке, так и при метаболической редукции комплексов [35, 36]. Мы полагаем, что светособирающие комплексы ССК I и ССК II передают энергию возбуждения хлорофилла на комплексы реакционных центров ФС I (СР I) и ФС II (СР II) соответственно.

Функциональная организация фотосистем

В настоящее время накопилось уже достаточно результатов, чтобы признать 4-компонентную организацию фотосистем [1]. Однако возникал вопрос, как будут функционировать нативные комплексы РЦ ФС I и ФС II при утрате светособирающих комплексов. Эффективно и быстро выполнить такую работу можно было только на живых клетках мутантов.

Фотосинтетическая активность. В работе были использованы клетки дикого типа K(+), мутанта C-48 без хлорофилла *b*, утратившего светособирающий хлорофилл *a/b*-белковый комплекс II (ССК II), двойного мутанта CC-107, не содержащего обоих светособирающих комплексов ССК I и ССК II, а также тройных мутантов, имеющих только комплексы РЦ ФС I (мутанты ACC-11, ACC-14, ACC-42) или ФС II (мутанты ACC-66, ACC-98, ACC-100, ACC-238).

При импульсном освещении у всех мутантов, содержащих ФС II, наблюдали (табл. 2) осцилляции с периодичностью максимального выделения O₂ на 3–4 вспышки [22]. Наличие осцилляций указывало на нормальное функционирование фер-

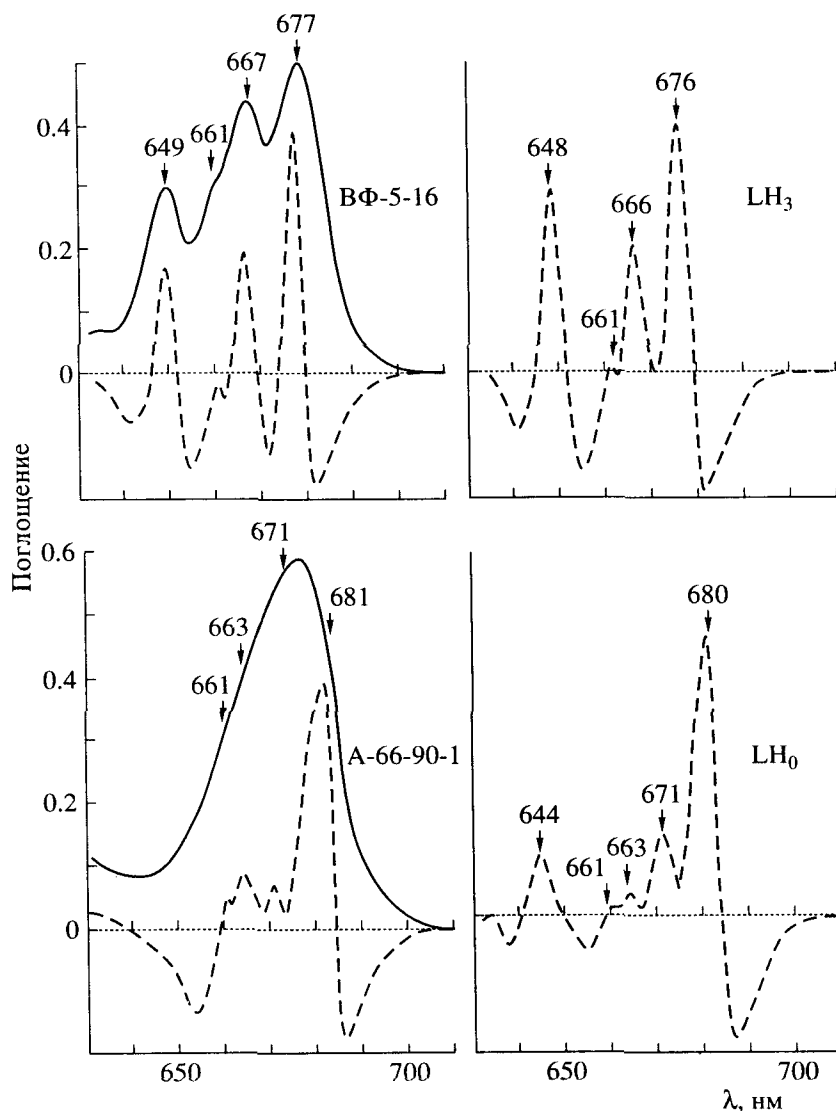


Рис. 6. Спектры поглощения хлорофилла (А – сплошная линия) и их вторые производные ($\Delta^2 A / \Delta \lambda^2$ – пунктирная линия) при температуре -196°C тройных мутантов, содержащих чистые ССК II (ВФ-5-16) или ССК I (А-66-90-1), а также выделенных из клеток дикого типа К(+) с помощью гель-электрофореза хлорофилл-белковых полос: LH_3 (мономер ССК II) и LH_0 (олигомер ССК I). Спектры второй производной для удобства представлены максимумами вверх.

ментной системы формирования O_2 . Высокий уровень стационарного выделения O_2 при импульсном освещении подтверждал нормальное функционирование системы окисления H_2O и реакционного центра ФС II [22, 23].

При непрерывном освещении клеток мутантов, сохранивших ФС II, первичный выброс O_2 был либо равный с клетками дикого типа К(+), либо превышал его, что указывало на сохранение нормального функционирования пула пластохинонов ФС II. Однако высокий стационарный уровень выделения O_2 мы отмечали только в клетках дикого типа К(+), а у мутантов С-48 и СС-107 для достижения максимального уровня требовалась более высокая интенсивность освещения из-за

потери одного или обоих светособирающих комплексов.

Способность стационарного выделения O_2 характеризовала нормальную работу электронно-транспортной цепи хлоропластов, включая функциональную активность ФС I, ФС II и системы темновой фиксации CO_2 . Отсутствие комплекса ФС I у тройных мутантов (АСС-66, АСС-98, АСС-100 и АСС-238) не позволяло длительно поддерживать высокий уровень выделения O_2 , поскольку после восстановления пула пластохинонов ФС II скорость выделения O_2 в них резко падала, но, как правило, не до нуля. Нами было установлено, что такой эффект обусловлен тем, что в отсутствие ФС I, хотя и с низкой скоростью,

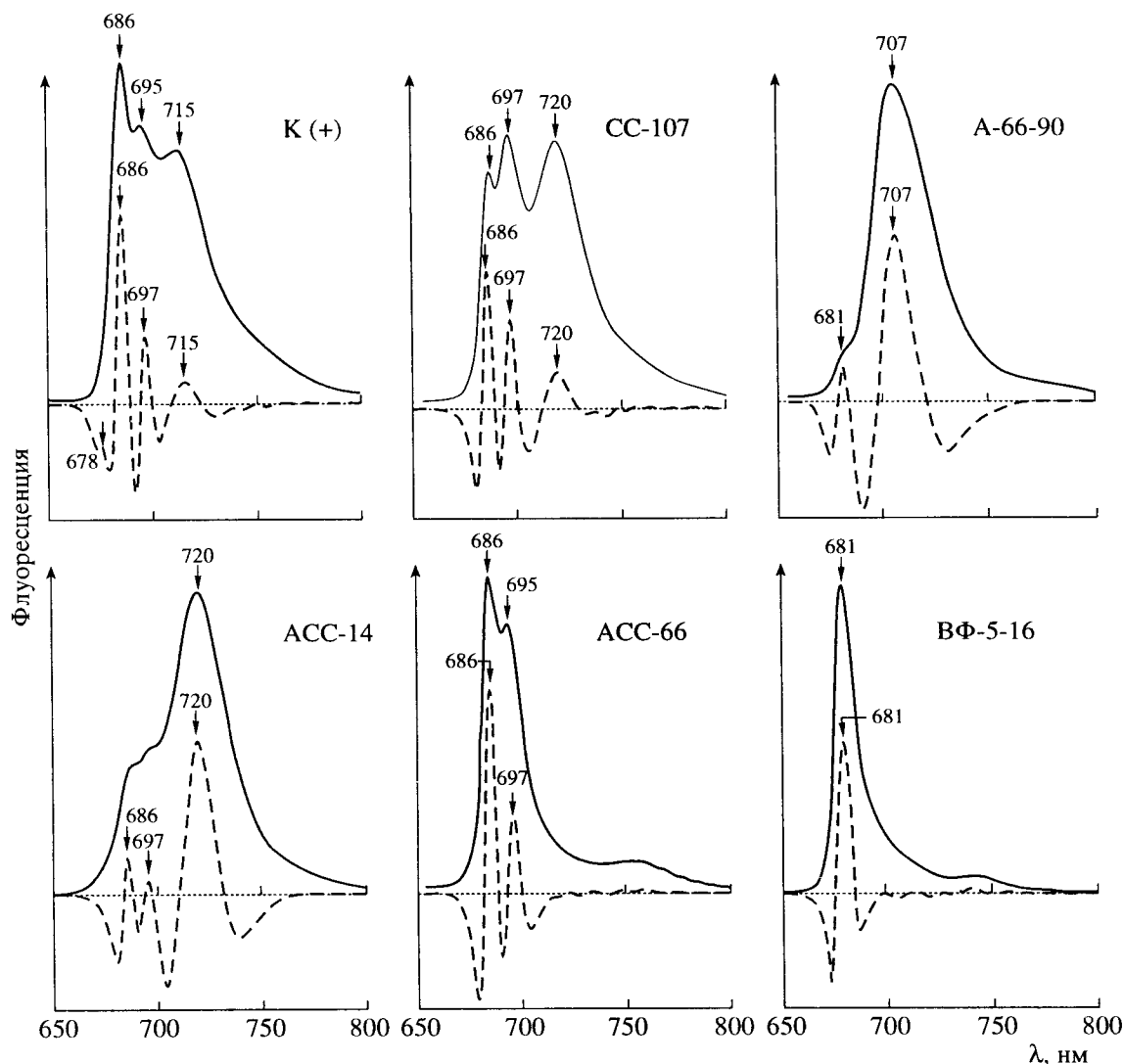


Рис. 7. Спектры излучения флуоресценции хлорофилла (F – сплошная линия) и их вторые производные ($\Delta^2 F / \Delta \lambda^2$ – пунктирная линия) при температуре -196°C клеток дикого типа K(+), двойных мутантов: содержащих только ФС I и ФС II (CC-107) или светособирающие комплексы ССК I и ССК II (A-66-90), а также тройных мутантов: с высоким содержанием комплекса ФС I (ACC-14) и накапливающих только комплекс ФС II (ACC-66) или светособирающий хлорофилл *a/b*-белковый комплекс ССК II (ВФ-5-16). Спектры второй производной для удобства представлены максимумами вверх.

возможен перенос электрона от ФС II на НАДФ или гидрогеназу с выделением H_2 [22, 37].

Таким образом, используя мутанты, нам удалось доказать, что в отсутствие светособирающих комплексов сохранялась потенциально нормальная активность комплексов реакционных центров. Однако уменьшение в содержании хлорофилла требовало более высокой освещенности. Чтобы оценить как изменялись величина фотосинтетической единицы и число реакционных центров, мы провели специальные исследования.

Величина фотосинтетической единицы. Ранее [21, 23] мы отмечали, что в результате мутаций, приводящих к потере ССК I или II и комплексов

РЦ ФС I или ФС II, накопление хлорофилла уменьшалось. Каждый из этих комплексов содержал примерно 25, 50 и 15, 10% соответственно [23, 38]. Столь существенные изменения в накоплении хлорофиллов снижали величину фотосинтетической единицы, рассчитанную по соотношению общего содержания молекул хлорофилла на число молекул хлорофилла П700 реакционных центров ФС I или феофитина и хлорофилла П680 реакционных центров ФС II (табл. 3).

Количественная оценка содержания реакционных центров ФС II и ФС I была проведена прямым их измерением. Реакционные центры ФС II анализировали по светоиндуцированному изме-

Таблица 3. Величина фотосинтетической единицы в клетках дикого типа К(+) и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, рассчитанная по светоиндуцированным изменениям поглощения П680, феофитина, П₇₀₀ и сигналам ЭПР I и ЭПР II [23–24]

Штаммы (мутанты)	Размер антенны ФС I и ФС II, установленный абсорбционным методом			Размер антенны ФС I и ФС II, определенный методом ЭПР		Антенна ФС I Антенна ФС II
	хлорофилл/П680	хлорофилл/Фео	хлорофилл/П700	хлорофилл/Пх ⁻	хлорофилл/П700 ⁺	
К(+)*	875 ± 46	809 ± 73	624 ± 37	860 ± 97	881 ± 44	0.7–1.1
С-48	340 ± 32	300 ± 34	404 ± 41	300 ± 31	432 ± 68	1.2–1.4
СС-107	264 ± 86	158 ± 49	152 ± 56	233 ± 45	223 ± 43	0.6–1.1
АСС-11	0	0	143 ± 56	0	118 ± 29	–
АСС-14	0	0	128 ± 32	0	111 ± 24	–
АСС-42	0	0	118 ± 37	0	117 ± 24	–
АСС-66	48 ± 15	38 ± 16	0	67 ± 21	0	–
АСС-98	60 ± 14	46 ± 17	0	84 ± 26	0	–
АСС-100	57 ± 11	48 ± 12	0	95 ± 18	0	–
АСС-238	51 ± 18	42 ± 12	0	129 ± 34	0	–

Примечание. Нуль указывает на отсутствие реакционных центров ФС I или ФС II. П680 – хлорофилл, Фео – феофитин и Пх⁻ – пластосемихион реакционного центра ФС II, а П700 – хлорофилл, П700⁺ – парамагнитные центры ФС I. Мутанты – см. табл. 1.

Таблица 4. Число реакционных центров в клетках дикого типа и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, рассчитанное по светоиндуцированным изменениям поглощения, феофитина, [23]

Штаммы	Число реакционных центров (n) ФС I и ФС II									$\frac{\text{РЦ ФС II}}{\text{РЦ ФС I}}$
	$n \times 10^6/\text{хлоропласт}$			$n \times 10^{14}/\text{г сырой массы}$			$n \times 10^{14}/\text{мг хлорофилла}$			
	П680	Фео	П700	П680	Фео	П700	П680	Фео	П700	
К(+)*	2.47	2.67	3.46	71.3	77.1	100.0	7.7	8.3	10.7	0.7–0.8
С-48	3.02	3.42	2.54	105.3	119.3	88.6	19.8	22.5	16.7	1.2–1.3
СС-107	2.35	3.93	4.09	55.2	92.2	95.8	26.3	42.7	44.5	0.6–1.0
АСС-11	0	0	1.78	0	0	31.6	0	0	47.1	—
АСС-14	0	0	1.84	0	0	42.1	0	0	52.7	—
АСС-42	0	0	2.06	0	0	51.4	0	0	57.1	—
АСС-66	2.75	3.48	0	49.2	62.1	0	140.5	177.4	0	—
АСС-98	2.58	3.37	0	45.0	58.7	0	112.5	146.8	0	—
АСС-100	3.31	3.93	0	53.2	63.1	0	118.1	140.3	0	—
АСС-238	3.09	3.75	0	55.5	67.4	0	132.1	160.4	0	—

Примечание. Представлены средние арифметические величины числа центров по 3–5 независимым экспериментам. Во всех опытах ошибка измерений не превышала 20%. См. примечание к табл. 3.

нению поглощения молекул хлорофилла П 680 и феофитина, а ФС I – по хлорофиллу П 700, а также по сигналам ЭПР-II и ЭПР-I соответственно. В этих исследованиях нами было установлено, что в клетках дикого типа К(+) величина фотосинтетической единицы составляла 620–880 молекул хлорофилла в расчете на один реакционный центр ФС I или ФС II. Потеря светособирающего комплекса II у мутанта С-48 уменьшала размер фотосинтетической единицы до 300–

430 молекул хлорофилла, а потеря обоих светособирающих комплексов I и II у мутанта СС-107 – до 150–260 молекул хлорофилла. У тройных мутантов, содержащих только комплекс ФС I (АСС-11, АСС-14, АСС-42), величина фотосинтетической единицы уменьшалась до 80–140 молекул хлорофилла, а чистый комплекс РЦ ФС II в нативном состоянии у мутантов АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238) содержал 40–60 молекул хлорофилла [22, 24]. Важно было знать, изменяется ли в на-

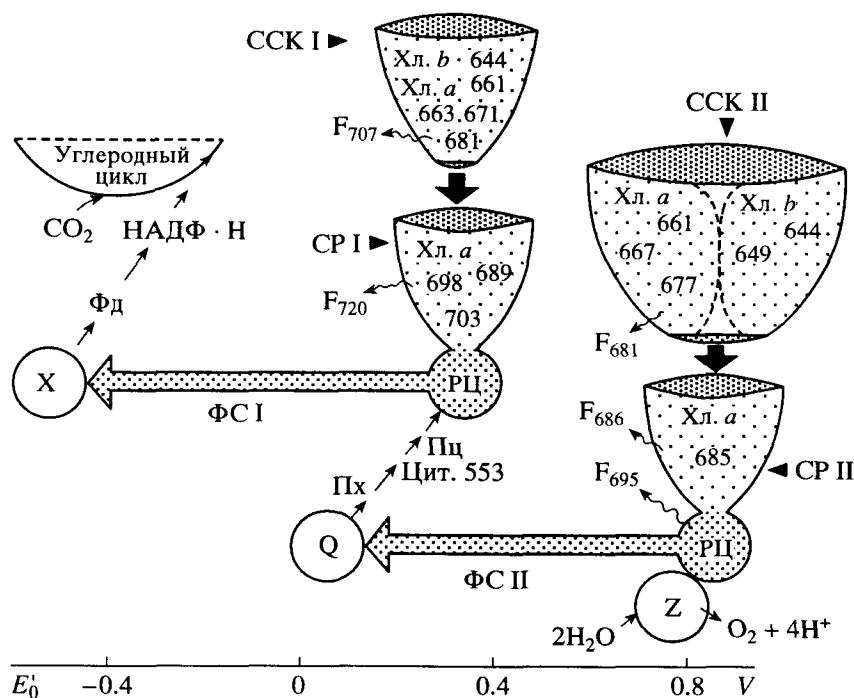


Рис. 8. Схема 4-компонентной организации фотосистем, показывающая закономерность распределения спектральных форм хлорофилла между 4 пигмент-белковыми комплексами и полосы излучения флуоресценции каждого из них. F – флуоресценция; Z – комплекс фотоокисления воды; Хл – хлорофилл.

тивном хлоропласте число РЦ ФС I и ФС II при столь существенном уменьшении содержания хлорофилла?

Число реакционных центров фотосистем. Обычно у штаммов, содержащих обе фотосистемы, соотношение реакционных центров ФС II/ФС I колебалось от 0.6 до 1.4 в зависимости от функционального состояния хлоропластов и стадии онтогенеза клеток. У функционально активных хлоропластов оно близко к 1.0 или выше. В наших исследованиях было установлено, что в клетках дикого типа K(+) и мутантов С-48 с потерей одного и СС-107 с отсутствием обоих светособирающих комплексов число РЦ ФС I и ФС II существенно не изменялось в расчете на один хлоропласт (табл. 4). Даже при потере комплексов РЦ ФС I или ФС II у тройных мутантов число оставшихся реакционных центров только ФС I или ФС II на клетку и на один хлоропласт оставалось близким к контрольному.

Однако в расчете на 1 мг хлорофилла относительное число реакционных центров ФС I и ФС II по мере редукции светособирающих комплексов ССК I и ССК II существенно возрастало, что прежде всего связано с уменьшением размера антенн. Этот факт указывал, во-первых, на отсутствие специфичности участия всех комплексов в организации фотосинтетических мембран хлоропластов, а во-вторых, на относительное обогащение

оставшихся мембран хлоропластов у тройных мутантов реакционными центрами ФС I и ФС II [10, 26]. Известно, что между количеством мембран в хлоропластах и содержанием хлорофилла существует прямая коррелятивная связь [39].

Колебания в числе центров ФС I и ФС II в расчете на грамм сырой массы обусловлены в основном различиями в накоплении метаболитов, преимущественно углеводов, в миксотрофных условиях. Аналогичные данные для нативных комплексов нам неизвестны. Однако если принять, что из основных полипептидов ФС-II только два высокомолекулярных 47 и 51 кД содержат хлорофилл по 23–25 молекул [24, 40], то антенна каждого реакционного центра должна включать около 50 молекул хлорофилла. Эти данные хорошо согласуются с организацией нативных комплексов ФС II у тройных мутантов ACC-66, ACC-98, ACC-100, ACC-238 *Chlamydomonas*, которые имеют 50 ± 10 молекул хлорофилла на один РЦ ФС II и обладают функциональными свойствами, характерными для клеток дикого типа. Содержание молекул хлорофилла нативного комплекса ФС I у тройных мутантов (ACC-11, ACC-14, ACC-42 (табл. 3) хорошо согласуется с общепринятым [41] в настоящее время представлением о величине ее фотосинтетической единицы, равной 110–160 молекул хлорофилла. Известно, однако, что лишь 30–60 молекул этого ком-

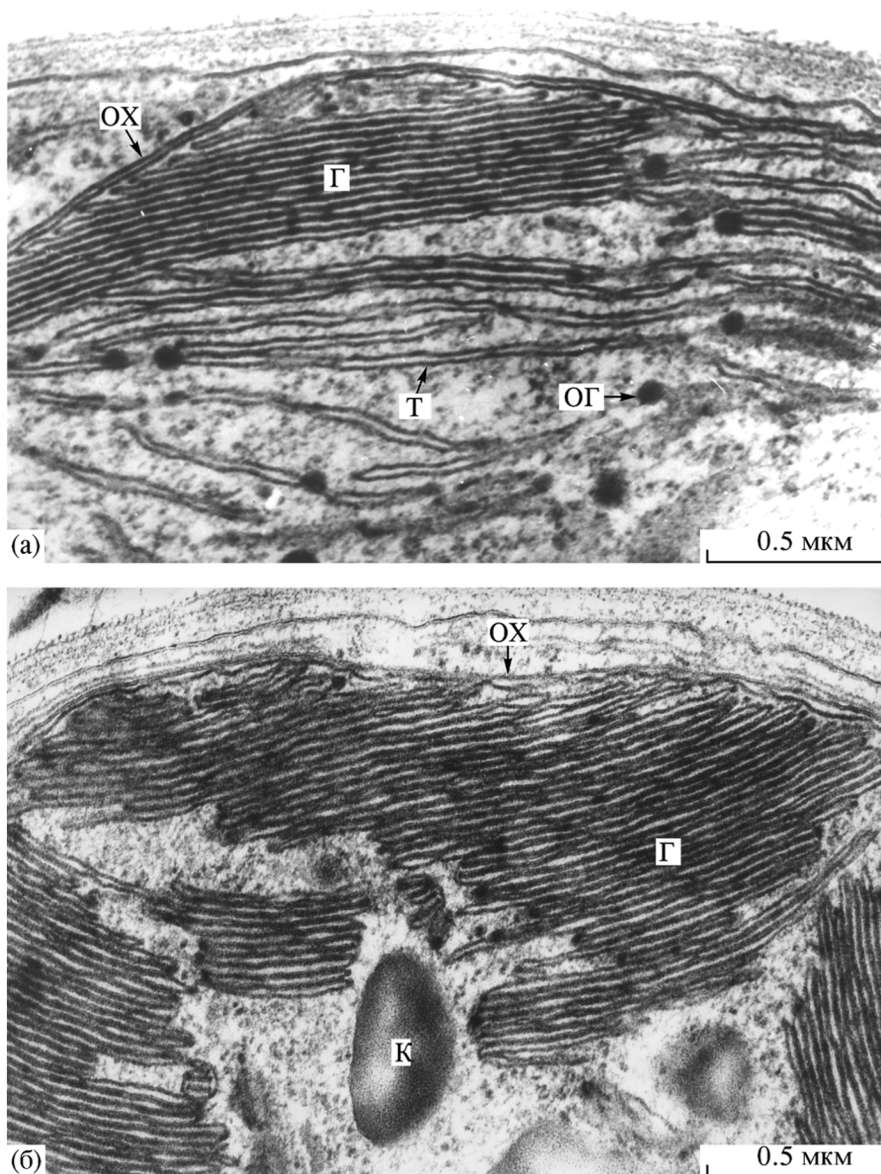


Рис. 9. Структурная организация хлоропластов клеток дикого типа К(+) с хорошо развитыми гранальными и межгранальными тилакоидами (а) и мутанта А-66 без ФС I с редуцированными межгранальными участками тилакоидов (б).

ОХ – оболочка хлоропласта, Т – межгранальные тилакоиды, Г – грана, ОГ – осмиофильные глобулы, К – крахмал.

плекса связаны с полипептидами с мол. м. 65, 68 кД РЦ/ФС I [40, 41]. Поэтому исходя из этих представлений можно полагать, что у тройных мутантов, содержащих комплекс ФС I [38, 40], помимо пигментов, связанных с внутренней антенной реакционного центра P700, накапливается еще 60–90 молекул хлорофилла внешней антенны, вероятно, непосредственно не передающей энергию возбуждения на реакционные центры.

Структурная локализация фотосистем в тилакоидах хлоропластов

С помощью пигментных мутантов *Chlamydomonas* методами электронной микроскопии нами были установлены все основные этапы фор-

мирования мембранной системы хлоропластов *Chlamydomonas*, характерные для пластид высших растений и, следовательно, были получены доказательства принципиальной идентичности организации мембран хлоропластов зеленой водоросли *Chlamydomonas* и высших растений [21, 39].

Пространственная локализация фотосистем в мембранах тилакоидов. Многие исследователи пытались локализовать фотосистемы в мембранах хлоропластов с помощью фракционирования, действия ингибиторов синтеза белков, детергентов, выделения гранальных и межгранальных участков. Ни один из этих методов не давал однозначных результатов. Мы использовали мутанты А-66 без ФС I, А-90 без ФС II и гибрида А-66-90 без обеих

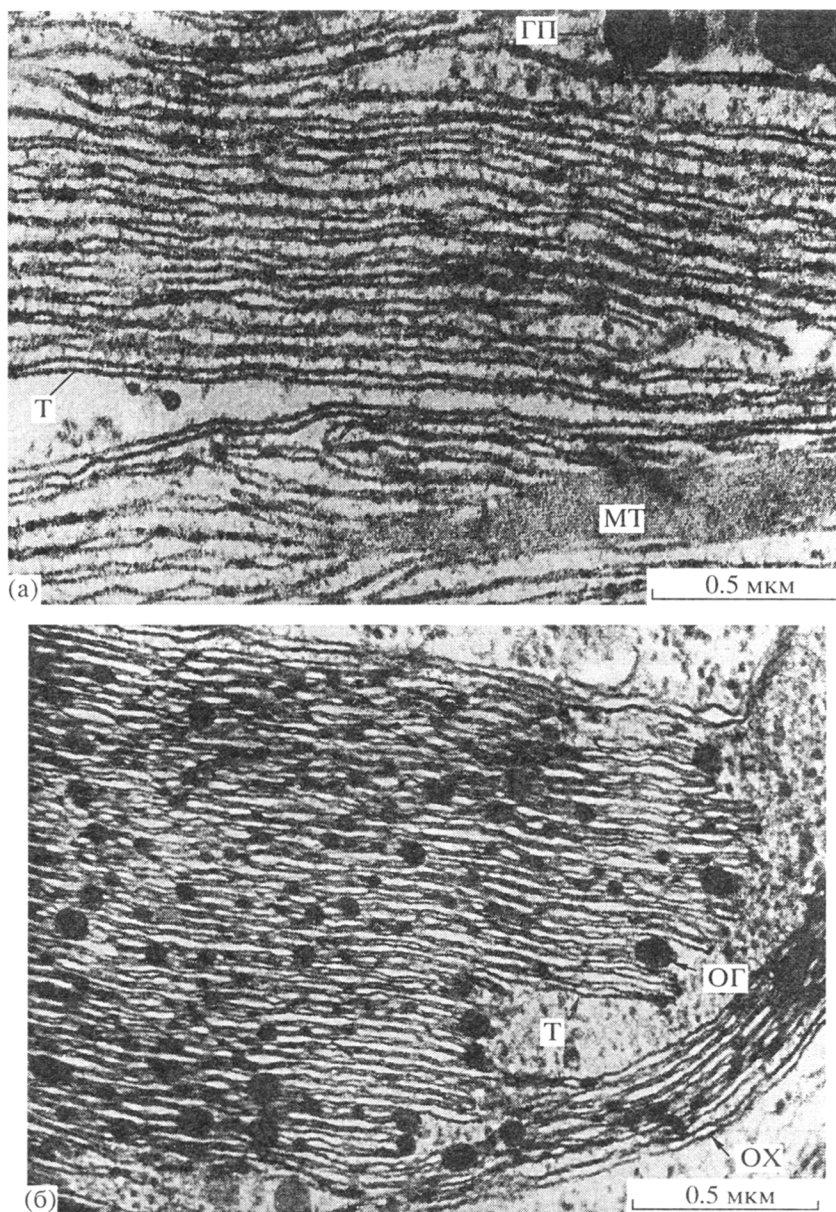


Рис. 10. Структурная организация хлоропластов клеток мутанта А-90 без ФС II (а) и гибрида А-66-90 без ФС I и ФС II (б), у которых нет гран и плотных контактов между тилакоидами.

Т – тилакоид, МП – миелиноподобное тело, образуемое у мутантов без ФС II за счет множественного слипания мембран тилакоидов, ГП – глазное пятно (стигма), ОГ – осмиофильные глобулы (липиды).

ФС, чтобы изучить, как в нативных клетках этих мутантов изменялась архитектура тилакоидов и локализация частиц, обусловленных белками фотосистем на гидрофобных поверхностях сколов замороженных мембран хлоропластов.

В электронно-микроскопических исследованиях тонких срезов клеток мутанта А-66 с неактивной ФС I было установлено, что в отличие от клеток дикого типа К(+) у них сильно редуцированы межгранные участки тилакоидов (рис. 9). Напротив, у мутанта А-90 с неактивной ФС II оставались хорошо развитые тилакоиды, но они не

имели плотных контактов, характерных для участков гран (рис. 10а). В клетках гибрида А-66-90, не имеющего обеих фотосистем, в хлоропластах формировались стопки тилакоидов, но они не образовывали плотных контактов между собой (рис. 10б). Эти результаты предполагали локализацию ФС I преимущественно в межгранных участках тилакоидов, а ФС II – в участках плотных контактов тилакоидов гран [25].

Однако, чтобы подтвердить это предположение, основанное на изменении архитектуры мембранной системы хлоропластов, необходимо бы-

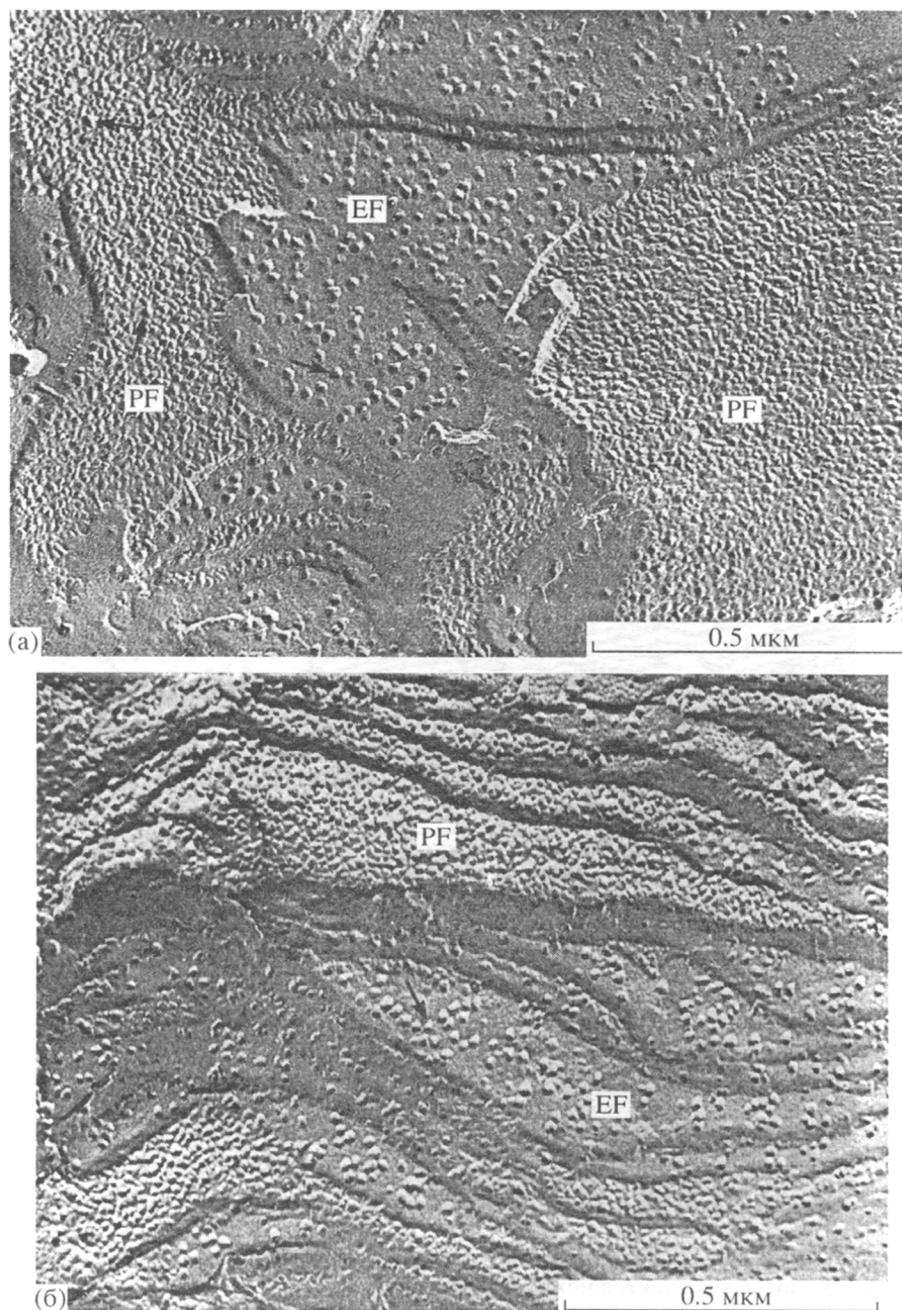


Рис. 11. Белковые частицы, выявляемые на внутренней (EF) и внешней (PF) гидрофобных поверхностях скола мембран тилакоидов после замораживания и скалывания (Freeze-fracture) (а) клеток дикого типа K(+) и (б) мутанта A-66 без ФС I, у которого на PF-поверхности нет 140 Å частиц. Стрелками показаны 140 Å частицы на PF-поверхности (а) и 160 Å частицы на EF-поверхности (а, б).

ло исследовать структурную локализацию хлорофилл-белковых комплексов в тилакоидах. Выявить локализацию белковых частиц в мембранах тилакоидов с помощью электронного микроскопа можно было методом замораживания—скалывания (freeze-fracture). Анализ белковых частиц, выявляемых на гидрофобных поверхностях сколов замороженных мембран хлоропластов

(рис. 11), позволил установить [10] четкую корреляцию между отсутствием хлорофилл *a*-белкового комплекса реакционного центра ФС I у мутанта A-66 и гибрида A-66-90 и 140 Å частиц на внешней гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов (PF_в) межгнанных участков (рис. 11б и 12б). В то же время отсутствие хлорофилл *a*-белкового комплекса ФС II у мутанта A-90 и гиб-

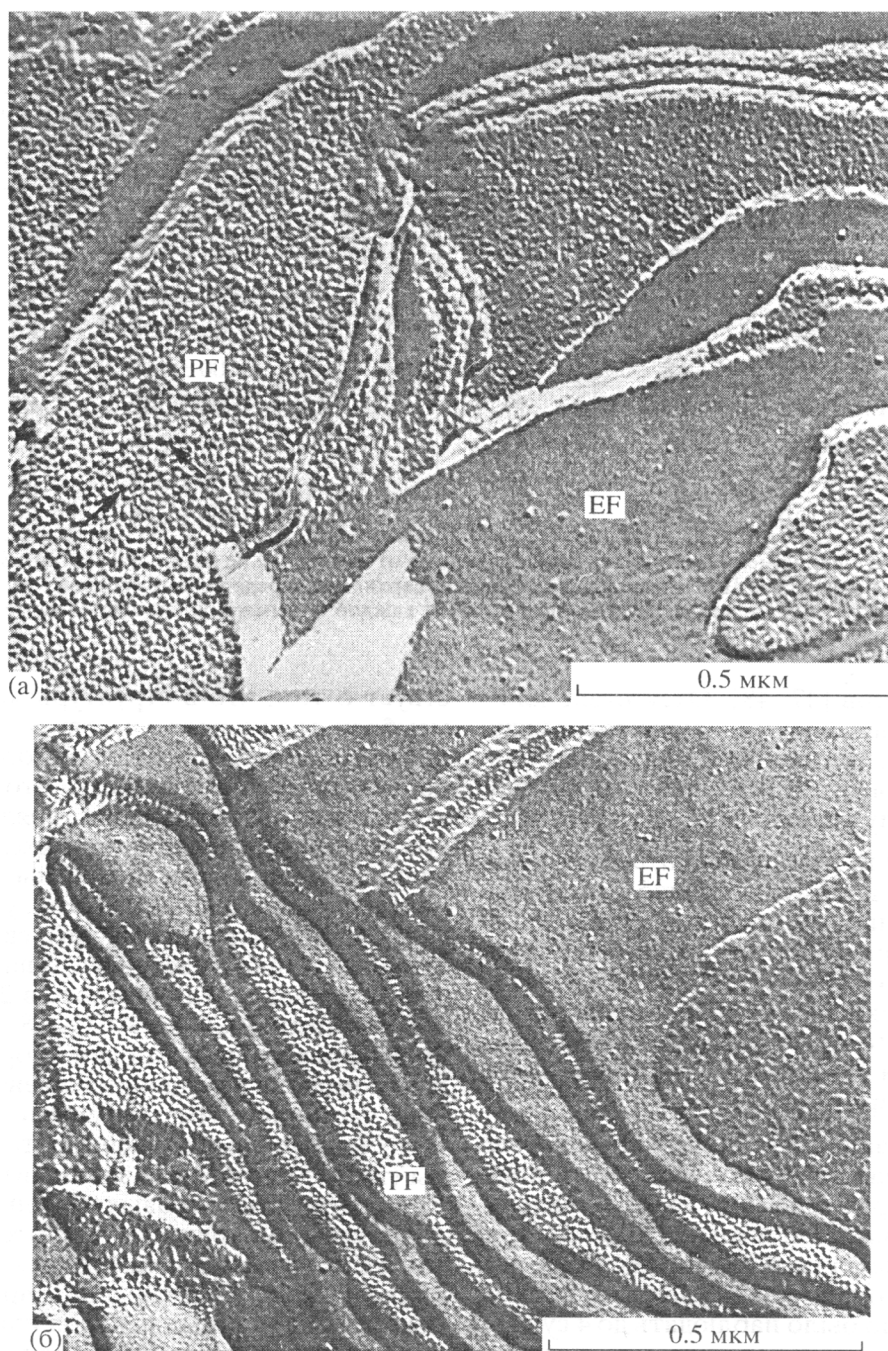


Рис. 12. Белковые частицы, выявляемые на гидрофобных поверхностях скола мембран тилакоидов клеток мутанта А-90 без ФС II (а), у которого на ЕF-поверхности нет 160 Å частиц и гибрида А-66-90 без ФС I и ФС II (б), у которого нет 140 Å частиц на РF-поверхности и 160 Å частиц на ЕF-поверхности. Стрелками показаны 140 Å частицы на РF-поверхности скола мембран мутанта А-90 (а).

рида А-66-90 четко коррелировало с потерей 160 Å частиц на внутренней гидрофобной поверхности скола мембраны (ЕF_s) в участках контактов тилакоидов гран (рис. 12). Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [42–45].

Важно отметить, что у мутанта С-48 без хлорофилла *b* число 160 Å частиц на ЕF-поверхности

не изменялось, но размеры их уменьшались до 80–110 Å [8, 10, 46]. Этот факт указывал на то, что 160 Å частицы представляют собой агрегаты, включающие в себя хлорофилл *a*-белковый комплекс РЦ ФС II и светособирающий хлорофилл *a/b*-белковый комплекс II (ССК II). Кроме того, этот факт предполагал преимущественную локализацию хлорофилла *b* в гранальных участках

Таблица 5. Плотность и соотношение (% от суммы) внутримембранных частиц на гидрофобных поверхностях скола гранальных и межгранных участков тилакоидов клеток дикого типа и мутантов

Штаммы	EF-поверхность, число частиц				PF-поверхность, число частиц		
	на 1 мкм ²	% от суммы			число частиц на 1 мкм ²	% от суммы	
		<100 Å	100–140 Å	>140 Å		<100 Å	>100 Å
K(+) граны	1100 ± 140	21	42	37	4000 ± 180	85	15
K(+) строма	450 ± 80	47	41	12	4400 ± 500	63	37
A-66 граны	1200 ± 64	15	38	47	4300 ± 290	86	14
A-90 строма	150 ± 56	88	12	0	3000 ± 110	69	31
A-66-90 строма	400 ± 45	81	19	0	4000 ± 240	85	15
C-48	1200 ± 50	26	62	12	2300 ± 235	62	38
C-107	1400 ± 140	15	80	5	2400 ± 360	60	40
ACC-238	2600 ± 130	14	80	6	4500 ± 650	80	20

Примечание. Размеры среднеарифметических величин, полученные от измерений не менее 500 частиц с 8–10 микрофотографий для каждого типа поверхностей. Число частиц для каждой поверхности определяли по среднему значению результатов измерений 7–10 поверхностей сколов площадью не менее 0.1 мкм² каждой и суммарной площадью не менее 1 мкм².

мембран хлоропластов [47, 48]. Отсутствие хлорофилла *b* ведет к ослаблению контактов между тилакоидами гран и предполагает важную роль этого светособирающего комплекса в образовании контактов между тилакоидами гран [47, 48].

Светособирающий хлорофилл *a/b*-белковый комплекс I (ССК I) преимущественно был локализован в межгранных участках в составе 140 Å частиц, которые представляют собой агрегаты этого комплекса и комплекса РЦ ФС I [25, 42–45]. Правомочность такого предположения подтверждалась тем, что потеря комплекса ФС I не приводила к полной утрате 140 Å частиц, а лишь уменьшала их размеры до 80 Å [10, 25, 46].

Сложная организация 160 Å частиц, которые локализуются в зонах плотного (истинного) контакта тилакоидов гран (рис. 13а) была выявлена нами на фотографиях EF-поверхности скола при больших увеличениях (рис. 13б). В этих 160 Å частицах, представляющих собой сложные белковые агрегаты, можно было наблюдать до 4 субчастиц (рис. 13б). Существует мнение, что в состав 160 Å частиц, помимо светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса II (ССК II) и хлорофилл *a*-белкового комплекса реакционного центра ФС II (состоящего из двух субъединиц: CP43 и CP47–D1–D2), может входить и цитохром *b/f*-комплекс [45]. Аналогичная 4-компонентная организация была обнаружена и на ES₂ гидрофильной поверхности со стороны внутритилакоидного пространства [46].

Следует особо отметить, что у двойных и тройных мутантов, также как и в клетках дикого типа и одинарных мутантов, сохраняется способность формировать достаточно развитую систему тилакоидов. Этот факт однозначно свидетель-

ствует о том, что в структурном формировании мембран тилакоидов участвуют все хлорофилл-белковые комплексы. Кроме того, была выявлена важная закономерность, что в тех случаях, когда в результате мутации терялся один, два или три комплекса, число оставшихся комплексов на единицу поверхности мембраны пропорционально увеличивалось (табл. 5). Так, у двойных мутантов CC-107, утративших два светособирающих комплекса, число частиц ФС II на 1 мм² поверхности мембраны увеличивалось в 2 раза, а у тройных мутантов ACC-66, ACC-238, у которых из 4-х формировался только один хлорофилл *a*-белковый комплекс реакционного центра ФС II, число этих частиц на 1 мм² возрастало в 4 раза [10, 26]. Полученные нами экспериментальные результаты (табл. 5) позволили заключить, что в норме у K(+) плотность белковых частиц на 1 мм² в мембране стехиометрически достаточно постоянна, так же как и размеры самих индивидуальных комплексов, и изменяется лишь при существенной потере реакционных центров или светособирающих комплексов. На основании всей совокупности полученных данных нами предложена схема (рис. 14) локализации хлорофилл-белковых комплексов как в гранальных, так и в межгранных участках тилакоидов *Chlamydomonas*. Комплексы являются важнейшими компонентами для структурной организации всей мембранной системы хлоропластов и высокоэффективного поглощения и запасаения солнечной энергии в процессе фотосинтеза. Поэтому в структуре и функционировании фотосинтетических мембран им принадлежит ключевая роль.

В настоящее время генетическими методами доказано (рис. 14), что все основные полипептиды ССК I и ССК II и гидрофильного комплекса

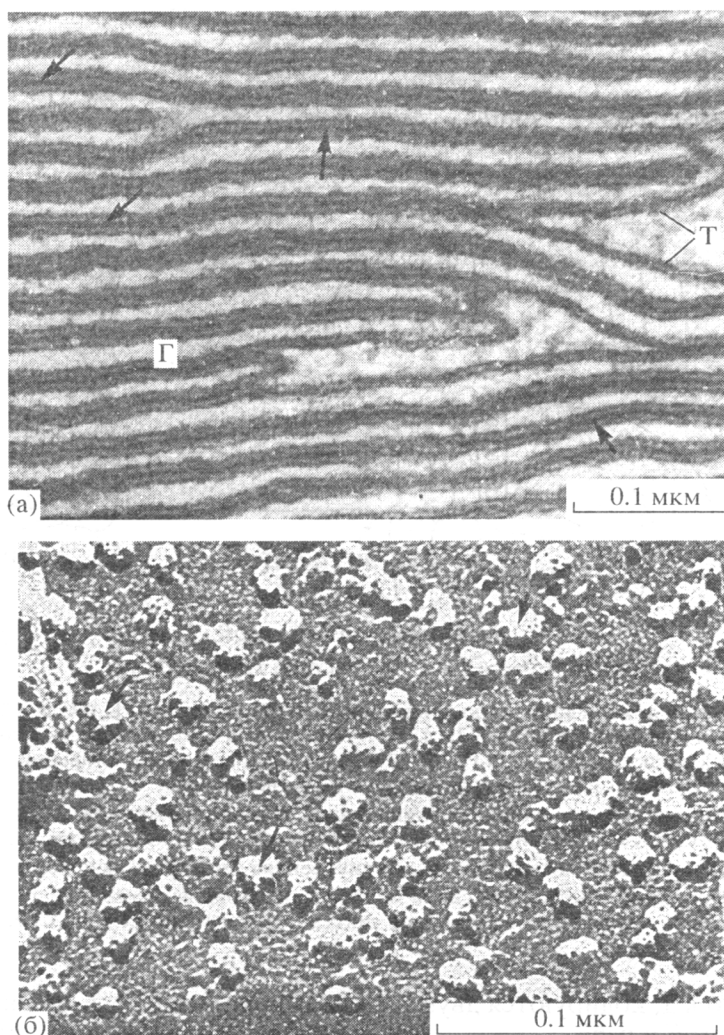


Рис. 13. Структура гранального участка мембран хлоропласта.

а – фрагмент тонкого среза мутанта А-66 без ФС I, показывающий наличие истинных контактов между тилакоидами, выявляемых в виде плотной черной линии (показано стрелками); б – то же, при большом увеличении. На сколах мембран тилакоидов гран на EF-поверхности можно видеть, что 160 Å частицы состоят из 3–4 субчастиц (показано стрелками).

фотоокисления H_2O (Z) контролируются ядерными генами, а полипептиды комплексов РЦ ФС I (СР I) и ФС II (СР II) – хлоропластными генами [28, 49].

Сейчас можно считать установленным, что в участках плотного контакта тилакоидов гран локализуется не менее 80% хлорофилл *a*-белкового комплекса реакционного центра ФС II (СР II) и примерно 80% светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса II (ССК II) [25, 43, 46]. В то же время основная часть хлорофилл *a*-белкового комплекса реакционного центра ФС I (СР I) и не менее 80% светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса I (ССК I) локализуется в межгранных участках тилакоидов [9, 10, 42, 44]. Причем при использовании метода замораживания-скалывания (freeze-fracture) белковые части-

цы комплексов РЦ ФС II и ССК II выявляются на EF_s – внутренней гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов в гранальных участках (см. рис. 14), а комплексы РЦ ФС I и ССК I на PFu – внешней гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов межгранных участков. Скол проходит по центру липидного бислоя мембраны (см. рис. 14).

Основу каждого из комплексов составляют специфические полипептиды, имеющие различные молекулярные массы. Так, комплекс реакционного центра ФС II составляют четыре основных полипептида с мол. м. 32 (D1-белок), 30 (D2-белок), 47 и 43 кД, которые контролируются хлоропластными генами *psbA*, *psbD*, *psbC* и *psbB* соответственно [49–51]. Две белковые субъедини-

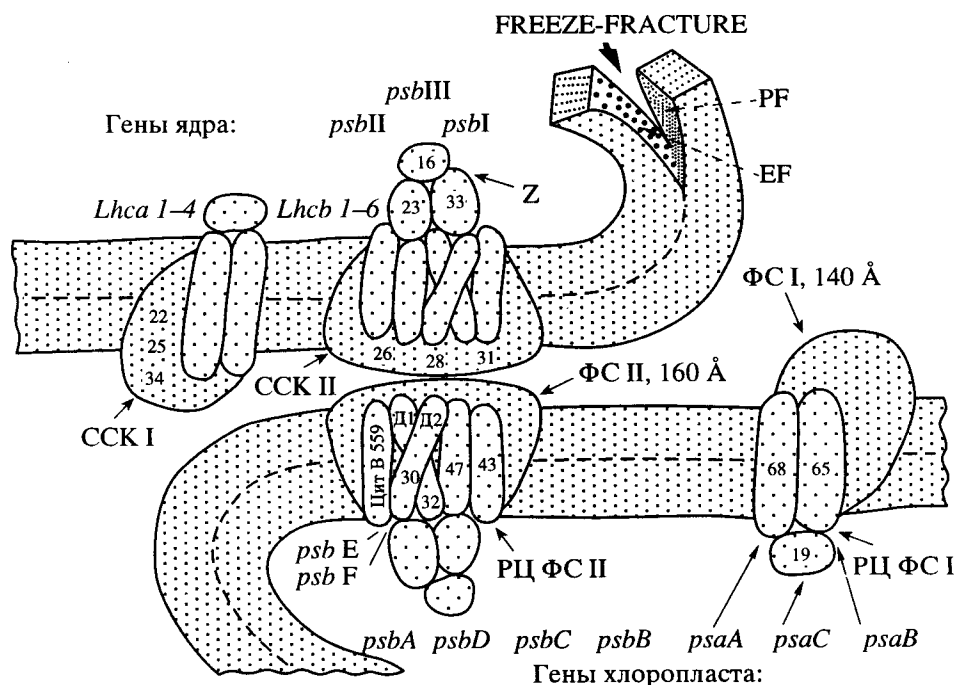


Рис. 14. Схема пространственной локализации хлорофилл-белковых комплексов РЦ ФС II (СР II) и ее светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса II (ССК II) в 160 Å частицах на EF-поверхности гранальных участков тилакоидов, а также хлорофилл-белкового комплекса РЦ ФС I и ее светособирающего хлорофилл-белкового комплекса I (ССК I) в 140 Å частицах на PF-поверхности межгранных участков тилакоидов.

Цифрами показаны молекулярные массы основных полипептидов, входящих в состав каждого из комплексов. В соответствии с последовательностью расположения полипептидов дан перечень генов, контролирующих их синтез.

Z – комплекс фотоокисления H_2O ; EF (the exoplasmic face) – внутренняя гидрофобная поверхность скола, PF (the protoplasmic face) – внешняя гидрофобная поверхность скола мембран тилакоидов; freeze-fracture – метод замораживания-скалывания; *Lhca 1-4* и *Lhcb 1-6* – гены, контролирурующие синтез полипептидов ССК I и ССК II соответственно.

цы цитохрома *b* 559, 4 и 10 кД, кодируются двумя хлоропластными генами *psbE* и *psbF*.

Основные полипептиды, составляющие комплекс реакционного центра ФС I, имеют мол. м.: 68, 65 и 19 (Fe-S-белок) кД и контролируются хлоропластными генами *psaA*, *psaB* и *psaC* соответственно [28, 45, 52].

Светособирающие комплексы генетически изучены в меньшей степени, особенно ССК I [21–38]. Однако, не вдаваясь в детальный анализ, можно считать установленным, что основными полипептидами светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса II (ССК II) являются полипептиды с мол. м. 26, 28 и 31 кД [18, 53], а светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса I (ССК I) являются полипептиды с мол. м. 22, 25 и 34 кД [33, 34]. Все полипептиды светособирающих комплексов кодируются ядерными генами [54, 55]. И хотя еще не для всех полипептидов установлены гены, но уже хорошо изучен ген, контролирующий синтез хлорофилла *b*, обозначенный для высших растений как ген *Cab*, (или *Lhcb*, по современной номенклатуре), а для *Chlamydomonas* – обозначенный нами как *cbn1* [27, 48]. Генетическим анализом установлено, что ген

cbn1 локализован в первой группе сцепления ядерных генов [56, 57]. Гены, кодирующие полипептиды ССК I в последнее время обозначают как *Lhca*-гены.

Гидрофильные белки комплекса фотоокисления воды ФС II (Z) с мол. м. 33, 23 и 16 кД, также контролируются ядерными генами *psbI*, *psbII* и *psbIII* соответственно. Они не содержат хлорофилла.

Итак, благодаря использованию мутантов *Chlamydomonas* нам удалось показать, что все нативные хлорофилл-белковые комплексы, участвующие в организации фотосистем, являются дискретными, генетически автономно детерминированными единицами. Формирование каждого из них может быть блокировано мутациями отдельных генов [21, 28, 48–52]. Генетический блок образования любого из комплексов обусловлен нарушением биосинтеза специфических белков-носителей и, как следствие, сопровождается потерей части хлорофилла, которая с ним ассоциирована. Специфичность локализации белков в мембранах хлоропластов и их взаимодействие с хлорофиллом определяют характерные для каждого из комплексов спектральные свойства, фо-

тохимическую активность, пространственную упаковку тилакоидов, обусловленную гетерогенным распределением хлорофилл-белковых комплексов в гранальных и межгранных участках фотосинтетических мембран.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50504).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Govindjee Y., Govindjee R. Introduction to Photosynthesis // Bioenergetics of Photosynthesis / Ed. Govindjee. N.Y.: Acad. Press, 1975. P. 1–50.
2. Thornber J.P. Chlorophyll-Proteins: Light-harvesting and Reaction Center Components of Plant // Ann. Rev. Plant Physiol. 1975. V. 26. P. 127–158.
3. Anderson J.M. P700 Content and Polypeptide Profile of Chlorophyll-Protein Complexes of Spinach and Barley Thylakoids // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 591. P. 113–126.
4. Butler W.L., Kitayama M. A Tripartite Model for Chloroplast Fluorescence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 3382–3385.
5. Ладыгин В.Г., Лебедев Н.Н. Спектры флуоресценции хлорофилла фотосистемы 1, фотосистемы 2 и светособирающего комплекса *Chlamydomonas reinhardtii* // Мол. биол. 1986. Т. 20. С. 407–414.
6. Ладыгин В.Г. Получение гибридного штамма *Chlamydomonas reinhardtii* с неактивными ФС-1 и ФС-2 и установление трех типов антенного хлорофилла в клетках *in vivo* // Генетика. 1980. Т. 16. С. 994–1001.
7. Ладыгин В.Г. Спектральные свойства хлорофилла-белкового комплекса фотосистемы 2 в нативном состоянии // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 851–859.
8. Miller K.R., Miller G.J., McIntyre K.R. The Light-harvesting Chlorophyll Protein Complex of Photosystem 2. Its Location in the Membrane // J. Cell Biol. 1976. V. 71. P. 624–638.
9. Anderson J.M., Melis A. Localization of Different Photosystems in Separate Regions of Chloroplast Membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 745–752.
10. Semenova G.A., Ladygin V.G. Topography of Thylakoid Membranes of Chloroplasts Based on the Analysis of *Chlamydomonas* Mutants Deficient in Chlorophyll-Protein Complexes // Photosynthetica. 1984. V. 18. P. 50–56.
11. Ладыгин В.Г. Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, Пущино // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. М.: ИФР РАН. 1991. С. 152–175.
12. Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты *Chlamydomonas reinhardtii*, индуцированные нитрозозетилмочвиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. С. 42–50.
13. Ладыгин В.Г., Ширишкова Г.Н. Влияние состава каротинов на устойчивость клеток водорослей к действию УФ-С-излучения // Физиология растений. 1993. Т. 40. С. 644–649.
14. Ладыгин В.Г., Ладыгина О.Н. Летальное и мутагенное действие γ -излучения на клетки двойных пигментных и нефотосинтезирующих мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Радиобиология. 1985. Т. 25. С. 267–270.
15. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1986. 559 с.
16. Ладыгин В.Г. Метод выделения нефотосинтезирующих мутантов водорослей по признаку карликовости колоний // Генетика. 1977. Т. 13. С. 905–910.
17. Ладыгин В.Г., Фомина И.Р., Биль К.Я., Москаленко А.А., Ширишкова Г.Н. Хлорофилл-белковые комплексы зеленых водорослей и высших растений. I. Идентификация хлорофилл-содержащих полос в геле с использованием мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 1421–1428.
18. Лебедев Н.Н., Тан Цзунчин, Ладыгин В.Г. Полипептидный состав и формирование пигмент-белковых комплексов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2072–2077.
19. Хатыпов Р.А., Ширишкова Г.Н., Ладыгин В.Г., Шувалов В.А. Полипептидный состав мембран тилакоидов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с неактивной фотосистемой 2 // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 573–577.
20. Lebedev N.N., Khatypov R.A., Ladygin V.G. Fluorescence Excitation Spectra and Decay Kinetics of Light-Harvesting Complex in *Chlamydomonas reinhardtii* Mutants // Photosynthetica. 1988. V. 22. P. 364–370.
21. Ладыгин В.Г. Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Пущино: ИПФС РАН, 1993. 49 с.
22. Ладыгин В.Г., Аллахвердиев С.И., Ананьев Г.М., Климов В.В., Мальцев С.В. Функциональная характеристика фотосистемы 2 мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, не содержащих светособирающего комплекса и фотосистемы 1 // Физиология растений. 1988. Т. 35. С. 14–23.
23. Ладыгин В.Г., Ширишкова Г.Н., Аллахвердиев С.И., Четвериков А.Г. Экспериментальный мутагенез в исследованиях фотосистем как ключевых звеньев фотосинтеза и продуктивности растений // Биопродуктивность агроценозов как комплексная проблема. Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1989. С. 123–140.
24. Ладыгин В.Г., Аллахвердиев С.И., Четвериков А.Г. Влияние редукции светособирающего комплекса на величину фотосинтетической единицы и число реакционных центров фотосистем у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 280–284.
25. Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Фотохимические свойства и структура мембран хлоропластов гибридного штамма *Chlamydomonas* с неактивными ФС-1 и ФС-2 // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 91–97.
26. Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Структурная организация мембран тилакоидов мутанта хламидомона-

- ды, лишённого светособирающего комплекса и фотосистемы I // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 223–230.
27. Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Мирная О.Н., Семенов Е.П., Гаевский Н.А., Болдина О.Н. Множественный аллелизм в гене *chl1*, контролирующем накопление хлорофилла *b* у *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. 1984. Т. 20. С. 775–781.
 28. Chunaev A.S. Genetics of Photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynthetica. 1990. V. 24. P. 283–308.
 29. Пакишина Е.Н., Лебедев Н.Н., Ладыгин В.Г., Красновский А.А. Состав хлорофилл-белковых комплексов и содержание каротиноидов в мутантах хламидомонады // Физиология растений. 1991. Т. 38. С. 655–661.
 30. Svensson P., Andersson E., Albertsson P.A. Heterogeneity among Photosystem I // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1060. P. 45–50.
 31. Ikeushi M. Subunit Proteins of Photosystem I // Plant Cell Physiol. 1992. V. 33. P. 669–679.
 32. Ikeushi M. Subunit Proteins of Photosystem II // Bot. Mag. Tokyo. 1992. V. 105. P. 327–337.
 33. Bassi R., Soen S.Y., Krank G., Zuber H., Rochaix J.D. Characterization of Chlorophyll-*a/b*-Protein of Photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Cell Biol. 1992. V. 267. P. 25714–25721.
 34. Zilber A.L., Malkin R. Organization and Topology of Photosystem I Subunits // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 901–911.
 35. Ladygin V.G., Bil' K.Ya. Chlorophyll Form of 684 nm as Antenna of Photosystem II in Chloroplasts of C₄-Plant Leaves // Photosynthetica. 1981. V. 15. P. 49–54.
 36. Ладыгин В.Г., Биль К.Я., Божок Г.В. Формы хлорофилла и структура хлоропластов мутантов гороха с неактивной фотосистемой I или фотосистемой II // Физиология растений. 1982. Т. 29. С. 479–487.
 37. Бойченко В.А., Аллахвердиев С.И., Ладыгин В.Г., Климов В.В. Функциональное сопряжение гидрогеназы с фотосистемой 2 в целых клетках мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. С. 995–998.
 38. Wollman F.-A., Bennoun P. A New Chlorophyll-Protein Complex Related to Photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 680. P. 352–360.
 39. Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1973. Т. 15. С. 810–817.
 40. de Vitry C., Wollman F.-A., Delepelaire P. Function of the Polypeptides of the Photosystem 2 Reaction Center in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 767. P. 415–422.
 41. Dunahay T.G., Staehelin L.A. Isolation of Photosystem I Complexes from Octyl Glucoside/Sodium Dodecyl Sulfate Solubilized Spinach Thylakoids. Characterization and Reconstitution into Liposomes // Plant Physiol. 1985. V. 78. P. 606–613.
 42. Miller K.R. A Chloroplast Membrane Lacking Photosystem I. Changes in Instacked Membrane Regions // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 592. P. 143–152.
 43. Simpson J.D. Freeze-Fracture Studies on Barley Plastid Membranes: IV. Analysis of Freeze-Fracture Particle Size and Shape // Carlsberg Res. Commun. 1980. V. 45. P. 201–210.
 44. Simpson J.D. Freeze-Fracture Studies on Barley Plastid Membranes: V. Viridis-n³⁴, a Photosystem I Mutant // Carlsberg Res. Commun. 1982. V. 47. P. 215–225.
 45. Olive J., Recouvreur M., Girard-Bascon J., Wollman F.-A. Further Identification of the Exoplasmic Face Particles on the Freeze-Fractured Thylakoid Membranes: a Study Using Double and Triple Mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* Lacking Various Photosystem II Subunits and Cytochrome *b₆/f* Complex // Eur. J. Cell Biology. 1992. V. 59. P. 176–186.
 46. Simpson J.D. Freeze-Fracture Studies on Barley Plastid Membranes: III. Location of the Light-harvesting Chlorophyll-*a/b*-Protein // Carlsberg Res. Commun. 1979. V. 44. P. 305–336.
 47. Burke J.J., Steinback K.E., Arntzen C.J. Analysis of the Light-harvesting Pigment-Protein Complex of Wild Type and a Chlorophyll *b*-less Mutant of Barley // Plant Physiol. 1979. V. 63. P. 237–243.
 48. Ладыгин В.Г., Азрикова И.М. Структурная организация хлоропластов у аллельных хлорофилл-*b*-дефицитных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1983. Т. 25. С. 1231–1235.
 49. Bondrean E., Otis C., Turmed M. Conserved Gene Clusters in Highly Rearranged Chloroplast Genomes of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Mol. Biol. 1994. V. 24. P. 585–602.
 50. Marder J.B., Barber J. The Molecular Anatomy and Function of Thylakoid Proteins // Plant Cell a Environ. 1989. V. 12. P. 595–616.
 51. Gruissen W. Chloroplast Gene Expression: How Plants Turn Their Plastids on // Cell. 1989. V. 56. P. 161–170.
 52. Leu S., White D., Michaelis A. Cell Cycle-Dependent Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Chloroplast Gene-Expression in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1049. P. 311–317.
 53. Phillip D., Ruban A.V., Horton P., Asato A., Young A.J. Quenching of Chlorophyll Fluorescence in the Major Light-harvesting Complex of Photosystem II: a Systematic Study of the Effect of Carotenoid Structure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1492–1497.
 54. Stayton M.M., Brosto P., Dunsmuir P. Characterization of a Full-Length Petunia cDNA Encoding a Polypeptide of Light-harvesting Complex Associated with Photosystem I // Plant Mol. Biol. 1987. V. 10. P. 127–137.
 55. Hoffman N.E., Pichersky E., Malik V.S. A cDNA Clone Encoding a Photosystem I Protein with Homology to Photosystem II Chlorophyll-*a/b*-Protein Polypeptide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 84. P. 8844–8848.
 56. Мирная О.Н., Фомина-Ещенко Ю.Г., Чунаев А.С. Локализация мутации *chl1* в первой группе сцепления ядерных генов *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. 1990. Т. 26. С. 958–960.
 57. Чунаев А.С., Столбова А.В., Квитко К.В., Александрова Н.Н., Чекунова Е.М., Мирная О.Н., Тугаринов В.В. Генетический контроль биосинтеза хлоропластных пигментов у зеленых водорослей // Генетика. 1994. Т. 30. С. 1075–1084.