

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ У МУТАНТА *XANTHA-702* ХЛОПЧАТНИКА *GOSSYPIUM HIRSUTUM* L.

© В. Г. Ладыгин,¹ Г. А. Семенова,² И. Д. Шегай¹

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН и ² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пуцино, Московская обл.;
электронный адрес: ladyginv@rambler.ru

Показано, что у мутанта *xantha-702* хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. на свету блокирован синтез 5-аминолевулиновой кислоты. На свету мутант накапливает 2—5 % хлорофилла от контрольного уровня. У него образуется очень мало пигмент-белковых комплексов ФС-I и ФС-II и останавливается формирование мембранной системы хлоропластов на ранних этапах, в большинстве случаев на стадии пузырьков и единичных коротких тилакоидов. Функциональная активность реакционных центров ФС-I и ФС-II близка к нулю. У мутанта *xantha-702* образуются только светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы I и II с максимумами флуоресценции хлорофилла при 728 и 681 нм соответственно. Делается вывод о том, что генетический блок ранних этапов биосинтеза хлорофилла у мутанта *xantha-702* нарушает формирование комплексов реакционных центров ФС-I и ФС-II и тормозит развитие всей мембранной системы хлоропластов.

Ключевые слова: *Gossypium hirsutum* L., мутант *xantha*, биосинтез пигментов, комплексы фотосистем, фотосинтез, ультраструктура, хлоропласты.

На основании исследований хлорофильных мутантов было обнаружено большое число ядерных и хлоропластных генов, контролирующих биосинтез, как пигментов, так и других компонентов фотосинтетических мембран (Jansson et al., 1992; Henningsen et al., 1993). Мутационные изменения таких генов препятствуют развитию и нормальному функционированию пластид, что и приводит к хлорофильной аномалии (Jansson, 1994; Krol et al., 1995; Falbel, Staehelin, 1996).

Большая коллекция индуцированных хлорофильных мутаций ячменя *Hordeum vulgare* L. впервые была описана Густавсоном в Швеции еще в 1940 г. (Gottschalk, 1964; Falbel et al., 1994). Он разделил хлорофильные мутации на группы *albina*, *xantha*, *alboviridis*, *viridis*, *tigrina*, *chlorina*, *virescence* и др. Позже были описаны мутации ядерных и хлоропластных генов, влияющих на биосинтез пигментов в хлоропластах у ячменя (Gottschalk, 1964; Nilan, 1964; Найлэн, 1967; Harrison et al., 1993; Prina et al., 2003). Выявлено множество мутаций у гороха *Pisum sativum* L. с генетическими блоками в биосинтезе хлорофилла и каротиноидов (Гостимский и др., 1991; Ладыгин и др., 2003). Получены такие мутанты у сои (Jansson et al., 1992), кукурузы (Scheer, 2003), пшеницы (Falbel et al., 1994), хлопчатника (Kohen, 1983) и подсолнечника (Усатов и др., 2004). Известно огромное число пигментных и морфологических мутаций у *Arabidopsis thaliana* (Насыров, 1975; Pogson et al., 1998; Cunningham, Gantt, 2001; Vabiyuchuk et al., 2003). Не меньшее число мутаций получено и у *Chlamydomonas reinhardtii* (Wang et al., 1975, 1984; Чунаев, 1994; Ладыгин, 1998; Harris, 2001).

Наряду с ядерными пигментными мутантами имеется большой набор пластидных мутаций, которые в соответствии с имеющейся классификацией делятся на три группы. В первую входят одноцветные пигментные мутанты — белые, желтые, светло-зеленые и темно-зеленые (Ладыгин и др., 1973, 1978). Во вторую группу включены пестролистные формы с разной окраской листьев — пятнистой или полосатой. В третью группу включены мутанты *virescence* — это растения, у которых в процессе онтогенеза наблюдается изменение окраски листьев (обесцвечивание или зеленение) от светло-зеленой до желтой и белой или от белесой до полностью зеленой. Наблюдаемые изменения в пигментации связаны с фотовыцветанием или, напротив, со стабилизацией молекул хлорофилла в ходе биогенеза хлоропластов (Насыров, 1975; Kohen, 1983). Уровень образования хлорофилла зависит от условий среды, в которых выращивается растение.

Степень формирования и развития мембранной системы хлоропластов у мутантов, как правило, коррелирует с накоплением хлорофилла (Ладыгин и др., 1973). Однако и при дефиците железа у светло-зеленых, желтых и белых листьев гороха одновременно с потерей хлорофилла наблюдается редукция мембранной системы хлоропластов (Ладыгин, Семенова, 1993; Ладыгин, 2005).

Сейчас известно, что пространственная упаковка тилакоидов в хлоропластах зависит от состава пигмент-белковых комплексов фотосистем I и II (ФС-I и ФС-II) (Ладыгина и др., 1980; Anderson, Melis, 1983; Anderson, 1986, 1999; Ладыгин, 1998). Было показано, что у мутантов, утративших комплексы реакционных центров ФС-I,

редуцируются межграницы участки тилакоидов. Напротив, при потере комплексов реакционных центров ФС-II в хлоропластах мутантов происходит разлипание тилакоидов в гранах, и мембранная система хлоропластов превращается в тяжи хорошо развитых единичных тилакоидов (Семенова и др., 1977; Ладыгин, 1998).

Ранее было установлено, что пропорциональное уменьшение комплексов ФС-I и ФС-II у мутанта *chlorotica 2014* сопровождалось частичной редукцией всей мембранной системы хлоропластов, но с наличием как гранальных, так и межграницы участков тилакоидов. Напротив, у мутанта *chlorotica 2004* потеря комплексов реакционных центров ФС-I ведет к редукции в хлоропластах главным образом межграницы участков тилакоидов (Ладыгин и др., 2003).

Известно, что ядерные и пластидные хлорофильные мутанты широко используются для установления взаимосвязи между геном и признаком (Насыров, 1975; Jansson et al., 1992; Ладыгин и др., 2003). Создание мутантных систем различной степени сложности представляется чрезвычайно важным (Насыров, 1975; Ладыгин, 1998; Cunningham, Gant, 2001). На базе Ташкентского университета были получены мутантные линии хлопчатника по типам *xantha* и *viridis* (Наджимов и др., 1985; Санамьян, 2003), которые позволяют изучать ранние этапы биогенеза фотосинтетических мембран хлоропластов.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы исследовать процесс биосинтеза хлорофилла у мутанта *xantha-702* и установить роль блокировки ранних этапов его биосинтеза на фотосинтез, активность реакционных центров ФС-I и ФС-II и ультраструктурную организацию хлоропластов.

Материал и методика

Объект. Для исследования брали семядольные листья мутантной линии Л-702 типа «*xantha*» хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. Мутант *xantha-702* был выделен во втором поколении (F₂), после обработки семян гибрида хлопчатника первого поколения (F₁, от скрещивания Л-73 × Л-453) 0.025%-ным раствором N-нитрозо-N-этилмочевины в течение 24 ч. Инбредные линии Л-73 и Л-453 из генетической коллекции *G. hirsutum* L. Лаборатории частной генетики хлопчатника Ташкентского университета различаются по ряду признаков. Линия Л-73 характеризуется пальчато-рассеченными листьями, полным отсутствием на семенах волокна и подпушка, мелкими коробочками и семенами. Растения линии Л-453 имеют пальчато-дольчатые листья, опушенные крупные семена и крупные коробочки. Обе линии имеют нормальную зеленую окраску вегетативных органов. При изучении характера наследования мутации *xantha-702* (с учетом маркерных признаков) все растения мутантной семьи самоопылялись, и собранные семена высевали на следующий год отдельно по семьям.

В F₃ и F₄ большинство гетерозиготных растений дало расщепление по менделевскому типу на два фенотипа — зеленые и желтые в соотношении 3 : 1 (Наджимов и др., 1985). Обнаруженная закономерность, характерная для ядерных генов, оказалась устойчивой и проявлялась в следующих поколениях. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что мутация *xantha-702* является моногенной, рецессивной, ядерной. Летальность проростков проявлялась только в том случае, когда му-

тантный ген *xan* находился в гомозиготном состоянии и растения имели желтую окраску (Наджимов и др., 1985). В гетерозиготном состоянии действие мутантного гена *xan* не проявлялось и все растения имели зеленую окраску. Надо отметить, что в F₂ (в скрещиваниях Л-73 × Л-453) наблюдалось расщепление не только по фенотипическому признаку «зеленый—желтый», но и по форме листовой пластинки. Во втором поколении (F₂) по форме листьев происходило расщепление на три типа — пальчато-дольчатые, пальчато-разделенные и пальчато-рассеченные листья в соотношении 1 : 2 : 1, характерном для ядерных генов. Растения каждого фенотипа самоопылялись, и полученные от них семена высевали на следующий год. Анализ расщепления на зеленые и желтые проростки с учетом формы листа показал, что внутри каждого фенотипа по форме листьев имело место расщепление по окраске на зеленые и желтые проростки в соотношении 3 : 1. Это позволило говорить о том, что сцепления между геном *xan* данной мутации и генами, детерминирующими форму листьев, не существует. Независимое наследование позволило заключить, что все изученные гены локализованы в ядре на разных хромосомах, т. е. в разных группах сцепления (Наджимов и др., 1985; Шегай, 1993; Санамьян, 2003).

Условия роста. В качестве родительского типа мы использовали проростки зеленых гомозиготных растений линии Л-702, семядольные листья которых после 4—8 сут темноты и 1 сут освещения синтезировали до 60—80 % от нормального количества хлорофилла световых проростков. У мутантных растений *xantha-702* того же возраста, гомозиготных по мутантной рецессивной аллели гена *xan*, хлорофилл практически не обнаруживался либо накапливался менее 5 % от нормы. Этиолированные 4—9-суточные проростки обоих типов, полученные проращиванием семян при 22 °С в темноте в рулонах из фильтровальной бумаги на дистиллированной воде, были фенотипически желтыми. Обычно 4—8-суточные этиолированные проростки родительского типа и мутанта *xantha-702* мы освещали постоянным светом (4000 лк либо 12 Вт/м²) в течение 1 или 5 сут.

Пигменты. Содержание хлорофиллов и каротиноидов в этиолированных и зеленеющих семядольных листьях проростков хлопчатника определяли спектрофотометрически в ацетоновых экстрактах (80 или 100 %; Шлык, 1971; Lichtenthaler, 1987) с помощью спектрофотометра Hitachi-356 (Япония).

Для изучения накопления в семядольных листьях эндогенной 5-аминолевулиновой кислоты их помещали в темноту на 24 ч (в случае этиолированных растений), или после 20 ч освещения (в случае зеленеющих растений) дополнительно помещали еще на 17 ч на свет на поверхность 0.05 М раствора левулиновой кислоты (опытные варианты), или на поверхность Трис-НСI-буферного раствора, рН 7.4 (контрольные варианты). Определение содержания 5-аминолевулиновой кислоты проводили, как описано ранее (Miller et al., 1979; Аверина и др., 1992; Шегай, 1993). Навески листьев по 0.5 г фиксировали паром, растирали в 3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты до гомогената, который нагревали на водяной бане при 100 °С в течение 15 мин и затем центрифугировали при 8000 g. После отделения супернатанта осадок ресуспендировали в 3 мл дистиллированной воды, помещали на 5 мин в кипящую водяную баню и вновь центрифугировали при 8000 g. Отделяли надосадочную жидкость, а осадок промывали 3 мл ацетатного буферного

раствора, pH 4.6, и осаждали при том же режиме. Объединенный супернатант наносили на колонку с Дауэксом 50 W × 2 (H⁺-форма), которую предварительно промывали дистиллированной водой до тех пор, пока величина pH элюата не становилась равной 5.5. Полосу 5-аминолевулиновой кислоты элюировали с колонки 1 М ацетатом натрия и собирали порциями по 2 мл, доводя pH каждой до 4.5 с помощью 0.2 мл 0.5 н. CH₃COOH. К 2 мл элюата приливали по 3 капли ацетил-ацетона, смесь тщательно встряхивали, нагревали 15 мин при 100 °С на водяной бане, охлаждали и к 2 мл раствора добавляли 2 мл модифицированного реактива Эрлиха (Mouzerall, Granick, 1956). Через 15 мин измеряли на спектрофотометре оптическую плотность раствора при 555 нм. В контрольную кювету помещали прошедшие такую же обработку элюаты из родительских растений. При расчете количества 5-аминолевулиновой кислоты использовали молярный коэффициент экстинкции $6.8 \cdot 10^{-4} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (Mouzerall, Granick, 1956).

Для определения накопления протохлорофиллида из экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты семядольные листья проростков родительского типа и мутанта *xantha-702* после 20 ч непрерывного освещения помещали на 17 ч в темноту на поверхность H₂O либо раствора 0.01 М 5-аминолевулиновой кислоты (Serva, Германия). После фиксации листьев паром пигменты извлекали смесью (ацетон : 0.1 н. NH₄OH = 9 : 1), затем делили их на фитольные и бесфитольные пигменты с помощью гексана (Shlyk et al., 1982). Количество протохлорофиллида рассчитывали по описанному ранее методу из спектров флуоресценции отмытых гексаном водно-ацетоновых экстрактов пигментов листьев (Shlyk et al., 1982).

Спектры поглощения хлорофилла при комнатной температуре (23 °С) и температуре жидкого азота (–196 °С) и их вторые производные регистрировали с помощью двухлучевого спектрофотометра Hitachi-356 (Япония). Условия и режим записи спектров описаны ранее (Ладыгин, 1979). Образцы помещали в кювету толщиной 0.1 см и записывали спектры при $\Delta\lambda = 1\text{—}2$ нм.

Спектры флуоресценции хлорофилла и их вторые производные регистрировали при температуре жидкого азота (–196 °С) на установке, описанной ранее (Ладыгин, 1985; Лебедев и др., 1985, 1988, 1991). Флуоресценцию хлорофилла возбуждали синим светом с длиной волны 436 или 480 нм.

Фотосинтез. Фотосинтетическую способность по выделению O₂ измеряли на высечках семядольных листьев диаметром 4 мм с помощью специального горизонтального датчика O₂ типа электрода Кларка с рабочей камерой диаметром 5 мм и глубиной 0.5 мм. Использовали фторопластовую мембрану толщиной 5 мкм. Высечку помещали в 50 мМ буферный раствор K₂HPO₄—KH₂PO₄ (pH 6.5) с 0.1 М KCl и освещали насыщающим красным светом интенсивностью 200 Вт/м² (Ладыгин и др., 1994).

Замедленную люминесценцию хлорофилла ФС-II высечек семядольных листьев проростков хлопчатника при освещении отдельными вспышками света измеряли на специальной установке (Ладыгин и др., 1988, 1994), содержащей фотоумножитель ФЭУ-100, стеклянный оптический фильтр КС-10 и светозащитную камеру с кюветой, в которую была помещена высечка листа диаметром 8 мм. Сигнал от фотоприемника поступал на предварительный операционный усилитель К 544 УД 1А (Россия) и записывался на быстродействующем самописце ENDIM 622.01 (Германия). Высечку освещали насыщающими

вспышками белого света от лампы ИСП-400 длительно-стью 1 мкс на уровне 50 % максимальной интенсивности. Частота вспышек в серии составляла 4 Гц.

Фотохимическую активность реакционных центров ФС-I и ФС-II определяли по светоиндуцированным изменениям поглощения хлорофилла P₇₀₀ (ΔA_{700}) для ФС-I и по кинетике переменной флуоресценции хлорофилла (ΔF) для ФС-II. Методики их определения описаны ранее (Ладыгин и др., 1990).

Электронная микроскопия. Структуру хлоропластов анализировали на срезах кусочков семядольных листьев, которые фиксировали 1.25%-ным глутаральдегидом на фосфатном буферном растворе, pH 7.4, в течение 1.5—2.0 ч, затем дофиксировали 1%-ным OsO₄ в течение 2 ч при комнатной температуре. Фиксированный материал обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70 и 96 %) по 10 мин в каждом, затем в 100%-ном абсолютном спирте 3 раза по 10 мин и в 100%-ном ацетоне 15 мин. Обезвоженные образцы заливали в Эпон-812. После полимеризации образцов в эпоксидной смоле через 2—3 нед при 37 °С получали тонкие срезы на микротоме LKB-III (LKB, Швеция), окрашивали уранил-ацетатом в течение 1 ч при 37 °С и контрастировали раствором цитрата свинца по Рейнольдсу в течение 25 мин при комнатной температуре. Срезы просматривали с помощью электронного микроскопа JEM-7A (JEOL, Япония).

В таблицах представлены результаты средних арифметических величин и их стандартных ошибок, полученных в 3—9 независимых экспериментах. Каждую из проб брали в 3 повторностях.

Результаты и обсуждение

Содержание пигментов. Биохимический анализ содержания хлорофилла в семядольных листьях подтвердил феноменологическую картину и позволил четко идентифицировать растения на их принадлежность к родительскому типу или мутантному типу *xantha-702*. Зеленые растения, в семядольных листьях которых наблюдалось наибольшее накопление хлорофилла, генотипически являлись гомозиготными по этому признаку и принимались нами за родительскую форму. Растения, семядольные листья которых накапливали хлорофилла в 2.0—2.5 раза меньше по сравнению с листьями родительского типа, были гетерозиготными и в опытах не использовались. Растения с фенотипически желтыми листьями были гомозиготными по мутантному гену *xan* и использовались как мутанты *xantha-702*.

Анализ содержания хлорофилла в зеленых листьях гомозиготных растений родительского типа и в листьях фенотипически желтого мутанта *xantha-702* показал, что у мутанта их накопление составляло 2—5 % от такового в контрольных растениях (табл. 1). Соотношение хлорофиллов *a/b* в листьях мутанта оказалось сниженным (1.4—1.7) по сравнению с этой величиной в листьях родительского типа (2.3—2.8), что предполагает относительно высокую долю светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов. Этот вопрос мы рассмотрим ниже.

Ранее было высказано предположение о том, что данная мутация вызывает нарушение светозависимых регуляторных механизмов, контролирующих синтез молекул 5-аминолевулиновой кислоты (Axelson, 1981; Аве-

Таблица 1

Содержание хлорофиллов *a* и *b* (мкг на 1 г сырой массы) в семядольных листьях проростков хлопчатника, росших 4 сут в темноте, а затем зеленеющих в течение 1 и 5 сут на свету

Вариант опыта	Время роста темнота + свет, сут	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Сумма хлорофиллов (<i>a</i> + <i>b</i>)	Сумма каротиноидов
Родительский тип	9 + 0	31.2 ± 11.2	19.5 ± 7.4	50.7 ± 12.8	78.6 ± 5.2
	8 + 1	594.5 ± 59.2	219.8 ± 18.6	814.4 ± 71.9	280.4 ± 7.8
	4 + 5	907.3 ± 56.3	394.5 ± 23.1	1301.8 ± 65.7	492.8 ± 9.5
Мутант <i>xantha-702</i>	9 + 0	29.3 ± 2.6	17.2 ± 1.8	46.5 ± 2.7	83.4 ± 6.9
	8 + 1	23.9 ± 2.4	15.0 ± 1.6	38.9 ± 2.1	57.2 ± 5.8
	4 + 5	20.3 ± 1.9	14.2 ± 1.5	34.5 ± 1.9	50.1 ± 6.2

Примечание. Даны средние арифметические величины и их стандартные ошибки для 3—5 независимых опытов.

рина и др., 1992; Шегай, 1993; Аверина, 1998). Можно предположить, что низкое содержание хлорофилла у мутанта *xantha-702* не является результатом их фотодеструкции. Уровень каротиноидов, имеющийся в мутанте *xantha-702*, вполне достаточен (табл. 1), чтобы защитить от фотодеструкции те малые количества хлорофилла, которые возникают в ходе зеленения мутантных растений, особенно при умеренных и низких уровнях освещения (Аверина и др., 1992).

Анализ общего содержания каротиноидов в листьях мутанта *xantha-702* и родительского типа, этиолированных в течение 4—8 сут темноты и зеленеющих в течение 1 и 5 сут на свету, показал, что в темноте количество каротиноидов было практически одинаковым в обоих типах растений. На свету в листьях родительского типа содержание каротиноидов в ходе зеленения в течение 1 и 5 сут резко возрастало одновременно с ростом синтеза хлорофилла. Однако в листьях мутанта *xantha-702* уже через 1 сут освещения было обнаружено заметное снижение каротиноидов до 20 %. Через 5 сут роста на свету уровень каротиноидов у мутанта *xantha-702* составлял лишь 10 % от такового в листьях родительского типа

(табл. 1). Оценка содержания хлорофилла в течение 1 и 5 сут зеленения на свету показала, что в отличие от накопления хлорофилла в листьях родительского типа в листьях мутанта *xantha-702* суммарное количество его падало и составляло лишь 4.8 и 2.6 % соответственно (табл. 1). Фенотипически листья мутанта оставались желтыми. Таким образом, у мутанта *xantha-702* на свету наблюдалось снижение содержания как хлорофилла, так и каротиноидов.

Опыты по накоплению 5-аминолевулиновой кислоты в темноте в семядольных листьях 4—9-суточных этиолированных проростков хлопчатника родительского типа и мутанта *xantha-702*, помещенных в темноту еще на 1 сут на поверхность 0.05 М раствора левулиновой кислоты, показали, что листья родительского типа и мутанта *xantha-702* накапливают практически одинаковое количество 5-аминолевулиновой кислоты (табл. 2).

Этому выводу не противоречат результаты, полученные при измерении содержания протохлорофиллида в этиолированных семядольных листьях обоих типов проростков хлопчатника того же возраста (табл. 3). Содержание протохлорофиллида при пересчете на сырую мас-

Таблица 2

Содержание 5-аминолевулиновой кислоты (нмоль на 1 г сырой массы) в семядольных листьях темновых проростков хлопчатника, выращенных в разных условиях

Условия роста	Родительский тип	Мутант <i>xantha-702</i>	Доля от контроля, %
Темнота, 4 сут на H ₂ O (исходные проростки)	53.6 ± 19.9	44.2 ± 15.7	82.5
Темнота, 4 сут на H ₂ O + 17 ч на 0.05 М растворе левулиновой кислоты	67.2 ± 18.2	55.2 ± 16.8	82.1
Темнота, 4 сут на H ₂ O + 20 ч свет, + 17 ч темнота на 0.05 М растворе левулиновой кислоты	963.0 ± 85.3	192.6 ± 24.3	20.0

Примечание. Даны средние арифметические величины и их стандартные ошибки для 7—8 независимых опытов.

Таблица 3

Содержание протохлорофиллида (нмоль на 1 г сырой массы) в семядольных листьях темновых проростков хлопчатника, зеленеющих 20 ч на непрерывном свету, а затем помещенных на 17 ч в темноту на H₂O или в раствор экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты

Условия роста	Родительский тип	Мутант <i>xantha-702</i>	Доля от контроля, %
Темнота, 4 сут на H ₂ O	1.31 ± 0.24	1.49 ± 0.38	113.7
Темнота, 4 сут на H ₂ O + 20 ч свет, + 17 ч темнота на H ₂ O	1.81 ± 0.32	2.07 ± 0.60	114.4
Темнота, 4 сут на H ₂ O + 20 ч свет, + 17 ч темнота на растворе 0.01 М 5-аминолевулиновой кислоты	36.75 ± 8.32	37.59 ± 10.21	102.3

Примечание. Даны средние арифметические величины и их стандартные ошибки для 9 независимых опытов.

су у мутанта *xantha-702* было равным или немного выше, чем в листьях родительского типа, но в пределах статистической вариабельности (погрешности). В обоих типах растений оно значительно изменялось от опыта к опыту, не показав при этом значимых различий между вариантами.

После переноса растений родительского типа на свет наблюдалось восстановление фотоактивного протохлорофиллида и снятие ограничений в синтезе эндогенной 5-аминолевулиновой кислоты и накоплении хлорофилла (Аверина, 1998). В этиолированных семядольных листьях 4-суточных проростков хлопчатника, зеленеющих в течение 20 ч на непрерывном свете, а затем помещенных в темноту на 17 ч на поверхность 0.05 М раствора леулиновой кислоты, отчетливо видно, что за период опыта общее количество 5-аминолевулиновой кислоты, обнаруженное в листьях мутанта *xantha-702*, составило лишь 20 % от ее содержания в листьях родительского типа (табл. 2).

В соответствии с наблюдаемой разницей в синтезе 5-аминолевулиновой кислоты в течение 1 и 5 сут роста на свету содержание хлорофилла в листьях обоих типов растений также сильно различалось (табл. 1).

Суммируя полученные нами результаты, можно заключить: проведенные опыты убедительно показали, что отсутствие зеленения этиолированных семядольных листьев мутанта *xantha-702* связано, вероятно, с нарушением ферментной системы, ответственной за синтез молекул 5-аминолевулиновой кислоты на свету (табл. 2). Однако последующие этапы цепи биосинтеза до протохлорофиллида и молекул хлорофиллов *a* и *b* не затронуты мутацией *xantha-702* (табл. 3).

Низкое содержание хлорофилла в листьях мутанта *xantha-702* по сравнению с листьями контрольных растений предполагает нарушение у него мембранной системы хлоропластов. Ранее на растениях гороха *Pisum sativum* было показано, что при накоплении хлорофилла менее 30 % от нормы уже наблюдались признаки деструкции мембранной системы хлоропластов (Ладыгин, Семенова, 1993), а при содержании хлорофилла менее 10 % уровень развития мембранной системы задерживался на ранних этапах формирования отдельных тилакоидов и зачаточных гран, включающих в себя в основном 2—3 небольших контактирующих тилакоида (Ладыгин и др., 1978, 2003). Повышенное накопление пигментов у темно-зеленых мутантов по сравнению с контрольными, напротив, сопровождалось формированием большого числа тилакоидов, заполняющих почти весь матрикс хлоропластов (Ладыгин и др., 1973). У мутантов *альбино*, не имеющих пигментов, развитие ламеллярной структуры блокировано на стадии формирования единичных пузырьков (Ладыгин и др., 1973, 1982). Можно полагать, что в нашем случае у мутанта *xantha-702* будут наблюдаться зачаточное формирование мембранной системы и очень низкое содержание пигмент-белковых комплексов ФС-I и ФС-II.

Ультраструктура хлоропластов. Исследование структурной организации хлоропластов семядольных листьев этиолированных проростков контрольных растений хлопчатника, росших в течение 9 сут в темноте, показало очень слабое развитие мембранной системы. Практически во всех пластидах листьев контрольных растений в темноте было обнаружено формирование крупных проламеллярных тел с четко выраженной гексагональной структурой (рис. 1, *a, б*). Некоторые пласти-

ды имели сформированные единичные тилакоиды без проламеллярных тел (рис. 1, *в*). Уровень развития пластид в этиолированных семядольных листьях проростков растений родительского типа соответствует уровню развития пропластид или этиопластов. Оболочка таких пластид хорошо сформирована, в матриксе содержится мало липидсодержащих пластоглобул. В некоторых пластидах встречаются небольшие зерна крахмала (рис. 1, *в*).

В этиолированных семядольных листьях проростков мутанта *xantha-702*, росших 9 сут в темноте, мембранная система пластид также развита очень слабо. Многие этиопласты содержат крупные проламеллярные тела (рис. 2, *a, б*) с отходящими от них короткими тилакоидами. Отдельные пластиды, как и у контроля, содержат несколько хорошо развитых тилакоидов и не содержат проламеллярных тел. Обычно именно в таких пластидах можно обнаружить небольшие единичные зерна крахмала (рис. 2, *в*). В пластидах мутанта *xantha-702* в отличие от пластид контроля чаще встречаются осмиофильные глобулы более крупных размеров. Кроме того, следует отметить и еще одну особенность мутантных пластид, связанную с образованием кольцевых тилакоидов (рис. 2, *в*). Известно, что подобные кольцевые структуры встречаются иногда у белых (бескаротиноидных) и желтых (бесхлорофильных) мутантов (Ладыгин и др., 1972, 1978, 1982; Семенова, Ладыгин, 1975). Можно предположить, что у мутанта *xantha-702* возможность формирования кольцевых мембран также связана с нарушением в синтезе хлорофилла (табл. 1, 2).

Размеры митохондрий и степень образования крист в обоих вариантах практически не различались, так что формирование митохондрий в темноте как в контроле, так и в клетках мутанта *xantha-702*, скорее всего, протекает нормально.

Если проростки хлопчатника из темноты переносили на свет, то у контрольных растений семядольные листья начинали быстро зеленеть и через 1 сут накапливали уже до 60—70 % хлорофилла от максимального (табл. 1). Через 5 сут роста на свету содержание пигментов в семядольных листьях контроля практически достигало максимального уровня.

Мы исследовали структурную организацию хлоропластов зеленых семядольных листьев контрольных растений хлопчатника после 5 сут роста на свету. Хлоропласты не только накапливали значительное количество пигментов, но и формировали хорошо развитую мембранную систему с наличием большого числа тилакоидов, формирующих грани и межграные участки (рис. 3, *a, б*). Такая структура мембранной системы характерна для фотосинтетически активных хлоропластов, что подтверждается накоплением в них значительного количества зерен крахмала (рис. 3, *б*). Как и у других видов растений, в хлоропластах хлопчатника содержится небольшое число осмиофильных глобул, обычно 1—3 на срез хлоропласта. На свету в клетках семядольных листьев образуются нормально развитые митохондрии с наличием большого числа крист (рис. 3, *в*).

На свету мембранная система пластид мутанта *xantha-702* представлена, как правило, единичными мембранными пузырьками или их цепочками (рис. 4, *a, б*). Появляется большое число осмиофильных глобул, свидетельствующих о деструктивных процессах в мембранах. В некоторых пластидах остаются лишь отдельные мембранные пузырьки, и тогда вся пластида становится заполненной только матриксом, подобно пластидам бе-

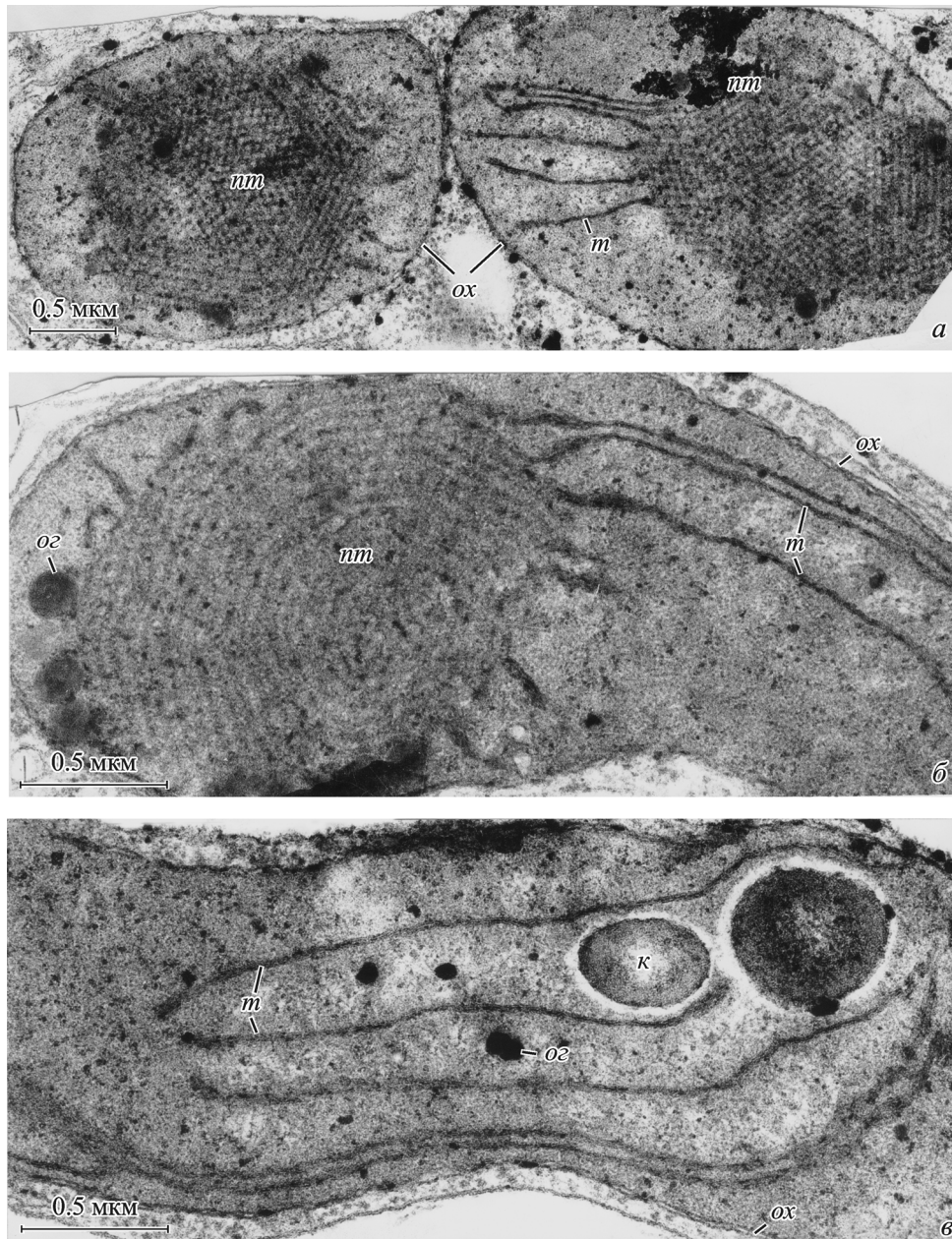


Рис. 1. Ультраструктурная организация пластид семядольных листьев проростков хлопчатника родительского типа, росших 9 сут в темноте.

Показано наличие проламеллярных тел (а, б), единичных тилакоидов и мелких крахмальных зерен (в). *ox* — оболочка хлоропласта, *nm* — проламеллярное тело, *t* — тилакоид, *og* — осмиофильные глобулы, *к* — крахмал.

лых мутантов (Ладыгин и др., 1972, 1982). Скорее всего, в таких пластидах разрушаются практически все пигменты, и они обесцвечиваются. Прямым показателем сильных деструктивных процессов в пластидах семядольных листьев мутанта *xantha-702* может служить накопление в отдельных пластидах большого числа осмиофильных глобул при почти полной потере мембранных структур (рис. 4, б). Митохондрии мутанта *xantha-702* имеют хорошо развитые кристы на свету и, по-видимому, не затронуты мутацией.

Описанные здесь результаты свидетельствуют о том, что в пластидах мутанта *xantha-702* в отличие от темнового варианта на свету наблюдается не развитие структуры, а, напротив, частичное разрушение уже сформированных в

темноте мембранных структур. Описанные ранее данные по кинетике накопления пигментов (Аверина и др., 1992) и представленные нами данные (табл. 1) с большей долей уверенности дают основание утверждать, что у мутанта *xantha-702* генетические изменения привели к нарушению механизма формирования пигмент-белковых комплексов.

Комплексы ФС-I и ФС-II. Оценку способности мутанта формировать пигмент-белковые комплексы мы провели спектральными методами. Анализ низкотемпературных спектров поглощения и их вторых производных у этиолированных семядольных листьев проростков растений родительского типа и мутанта *xantha-702*, росших в течение 4—8 сут в темноте, а затем в течение 1 и 5 сут на непрерывном свету, показал, что в листьях роди-

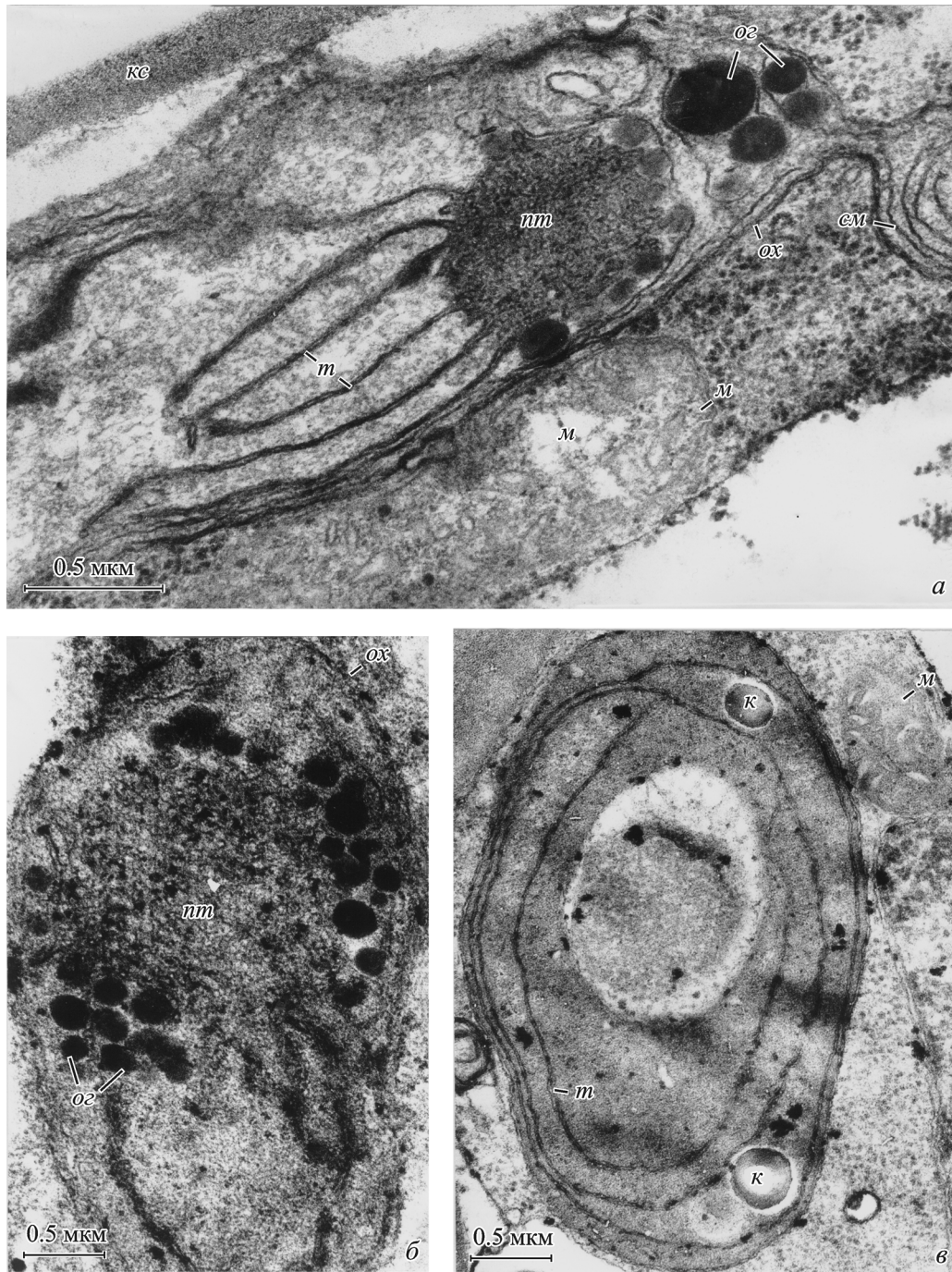


Рис. 2. Ультраструктурная организация пластид семядольных листьев проростков хлопчатника мутанта *xantha-702*, росших 9 сут в темноте.

Показано наличие проламеллярного тела и осмиофильных глобул (а, б), единичных тилакоидов и зерен крахмала (в). см — спиралевидные мембраны, м — митохондрия, кс — клеточная стенка; остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

тельского типа хорошо выявляются максимум при 649 нм, соответствующий хлорофиллу *b*, и 7 полос поглощения при 661, 670, 677, 684, 690, 697 и 708 нм, принадлежащих хлорофиллу *a* (рис. 5). Эти данные подобны тем, которые были получены ранее для высших растений как с C_3 -, так и с C_4 -типами углеродного метаболизма (Ladygin, Bil', 1981; Ладыгин, 1998). Известно, что формы хлорофилла *b* при 649 нм и хлорофилла *a* при 661, 670, 677 и 679 нм принадлежат светособирающим комплексам I и II, а хлорофилла *a* при 684 нм является основ-

ной полосой антенны реакционного центра ФС-II, тогда как формы хлорофилла *a* при 690, 697 и 708 нм принадлежит антенне реакционного центра ФС-I (Ладыгин, 1998; Ладыгин, Вайшла, 2005). Эти данные свидетельствуют о содержании в хлоропластах листьев родительского типа хлопчатника хорошо развитых светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов I и II, а также хлорофилл-*a*-белковых комплексов реакционных центров ФС-I и ФС-II (Ладыгин, 1998, 2005; Chen et al., 2001).

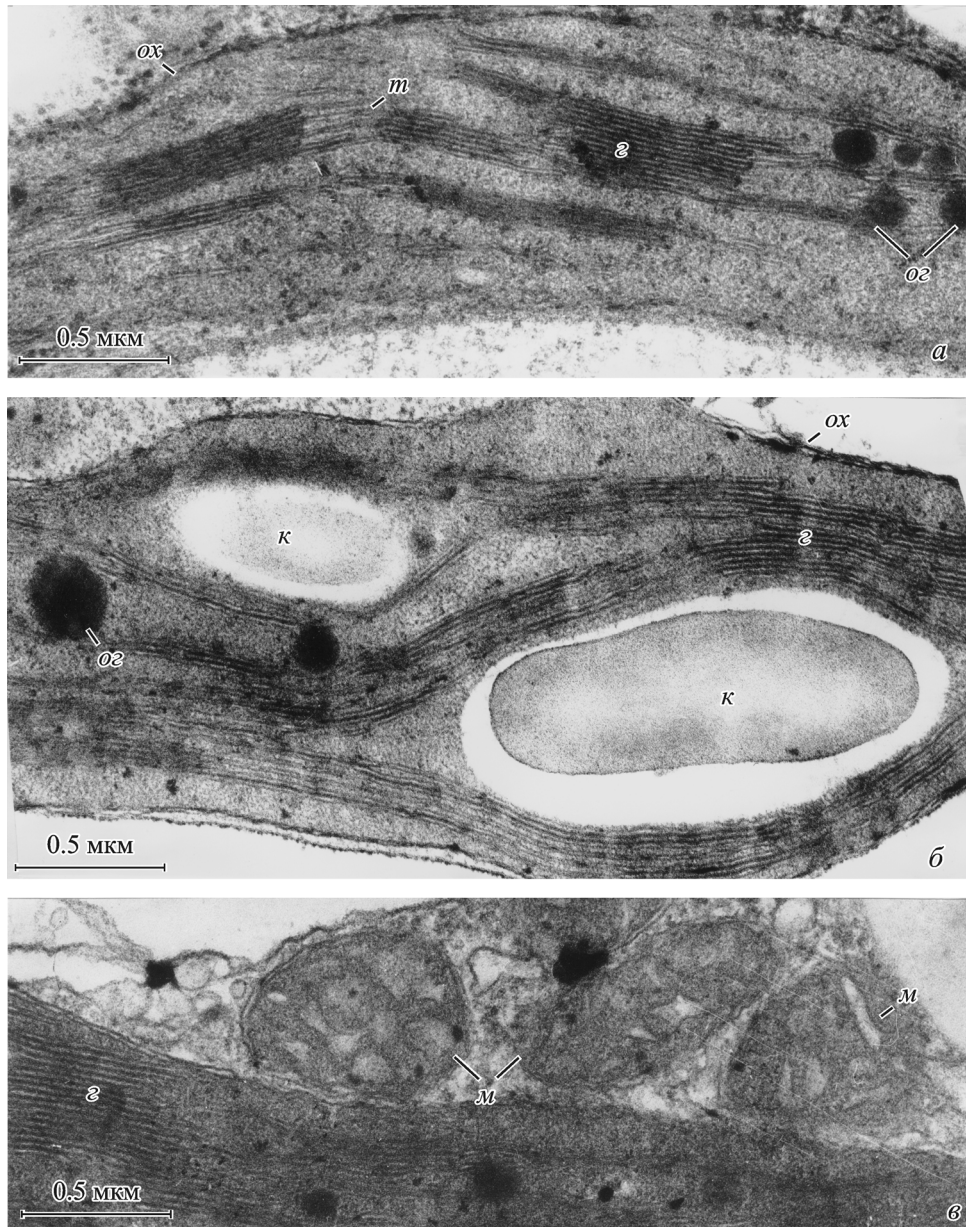


Рис. 3. Ультраструктурная организация хлоропластов семядольных листьев проростков хлопчатника родительского типа, росших 4 сут в темноте и 5 сут на свету.

Показано наличие хорошо развитых гран (а), крупных зерен крахмала (б) и сформированных митохондрий (в), г — грана; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

Анализ спектров поглощения и их вторых производных семядольных листьев 4—8-суточных темновых проростков мутанта *xantha-702*, а также после освещения непрерывным светом в течение 1 и 5 сут не выявил полосы хлорофилла *a* с максимумом при 684 нм. Эти данные указывают на значительную редукцию или полное отсутствие у мутанта *xantha-702* сформированного комплекса реакционного центра ФС-II. Наличие малоинтенсивных длинноволновых полос при 690, 697 и 708 нм указывало на сохранение способности (хотя и очень слабой) хлоропластов мутанта *xantha-702* к формированию антенны пигмент-белкового комплекса реакционного центра ФС-I. Однако в процессе роста на свету интенсивность этих полос падает, что указывает на вероятность уменьшения содержания хлорофилла и самого

комплекса. Следует отметить, что в листьях мутанта *xantha-702* тем не менее формируются светособирающие комплексы I и II. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что после этапа синтеза 5-аминолевулиновой кислоты данная мутация не влияет на процесс биосинтеза хлорофиллов *a* и *b*.

Хорошо известно, что мутанты высших растений и водорослей, которые накапливают мало хлорофилла *b* или не содержат его совсем, обычно дефицитны или вообще не формируют светособирающего хлорофилл-*a/b*-белкового комплекса II (Eskins et al., 1983; Terao et al., 1985; Murray, Kohorn, 1991; Harrison et al., 1993; Tanaka et al., 1993, 1994, 1998; Falbel et al., 1994, 1996; Krol et al., 1995; Falbel, Staehelin, 1996). Показано, что у растений светособирающий комплекс II содержит около полови-

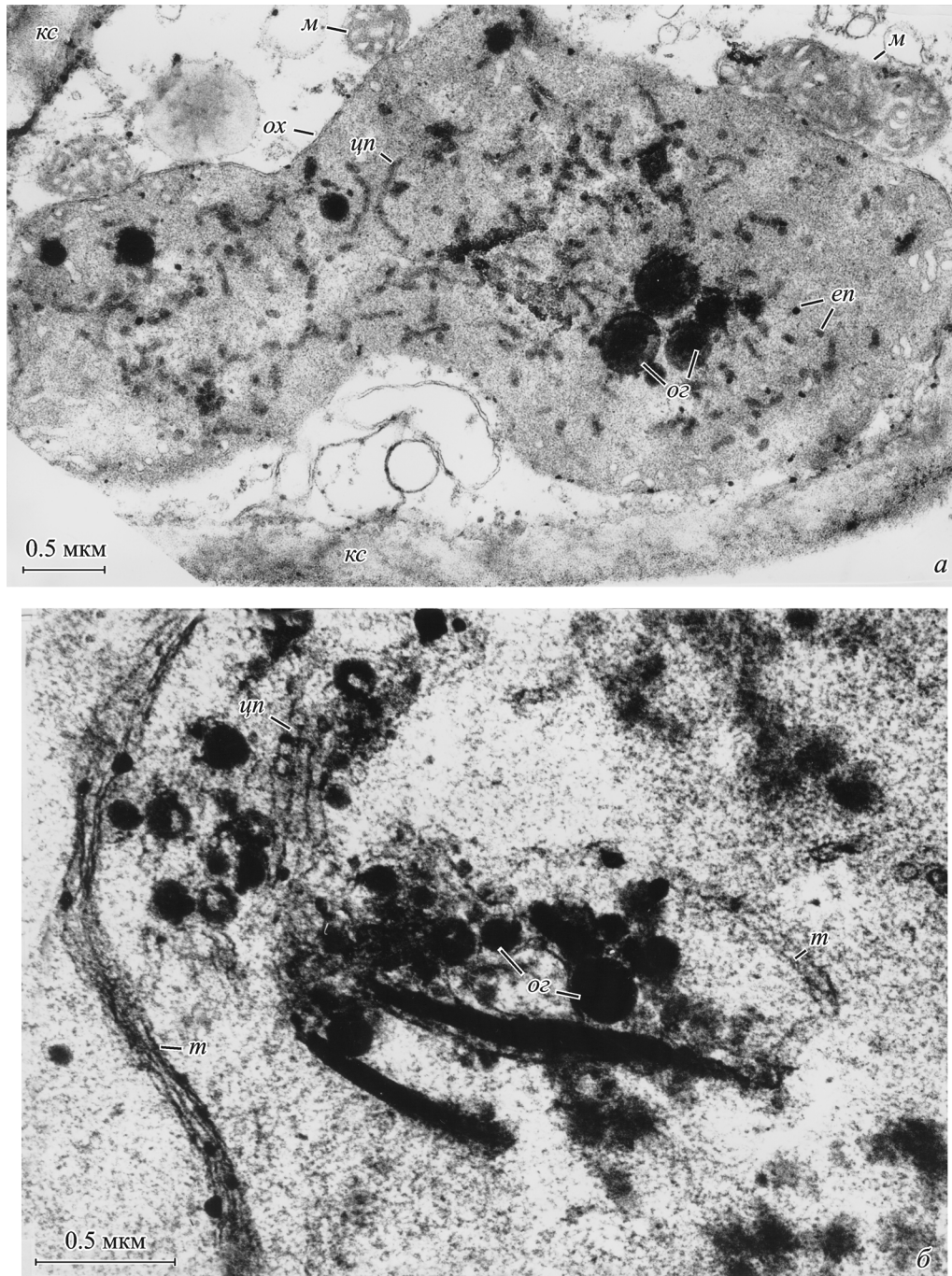


Рис. 4. Ультраструктурная организация пластид семядольных листьев проростков хлопчатника мутанта *xantha-702*, росших 4 сут в темноте и 5 сут на свету.

Показано наличие единичных пузырьков и их цепочек (а), а также разрушение мембранных структур и образование осмиофильных глобул (б). *en* — единичные пузырьки, *цп* — цепочки пузырьков; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

ны всего хлорофилла тилакоидных мембран, в том числе более 80 % хлорофилла *b* (Ладыгин, Агрикова, 1983; Zuber, 1985; Ладыгин, 1998; Ruban et al., 2003).

О наличии комплексов можно судить и по спектрам флуоресценции хлорофилла. Сейчас установлено, что низкотемпературные спектры флуоресценции хлорофилла зеленых листьев высших растений имеют три основные полосы излучения с максимумами 686, 695 и 733 нм. Коротковолновая полоса низкотемпературной флуоресценции при 681 нм обычно не видна, так как почти со

100%-ной эффективностью передает поглощенную энергию на полосу 686 нм. Флуоресценция при 681 нм обусловлена свечением светособирающего хлорофилл-*a/b*-белкового комплекса II (Ладыгин, Лебедев, 1986; Lebedev et al., 1988). Полосы низкотемпературной флуоресценции хлорофилла при 686 и 695 нм принадлежат антенне реакционного центра ФС-II (Dekker et al., 1995). Полоса при 728 нм принадлежит светособирающему хлорофилл-*a/b*-белковому комплексу I, а при 720 нм — антенне реакционного центра ФС-I (Ладыгин, 1998). Со

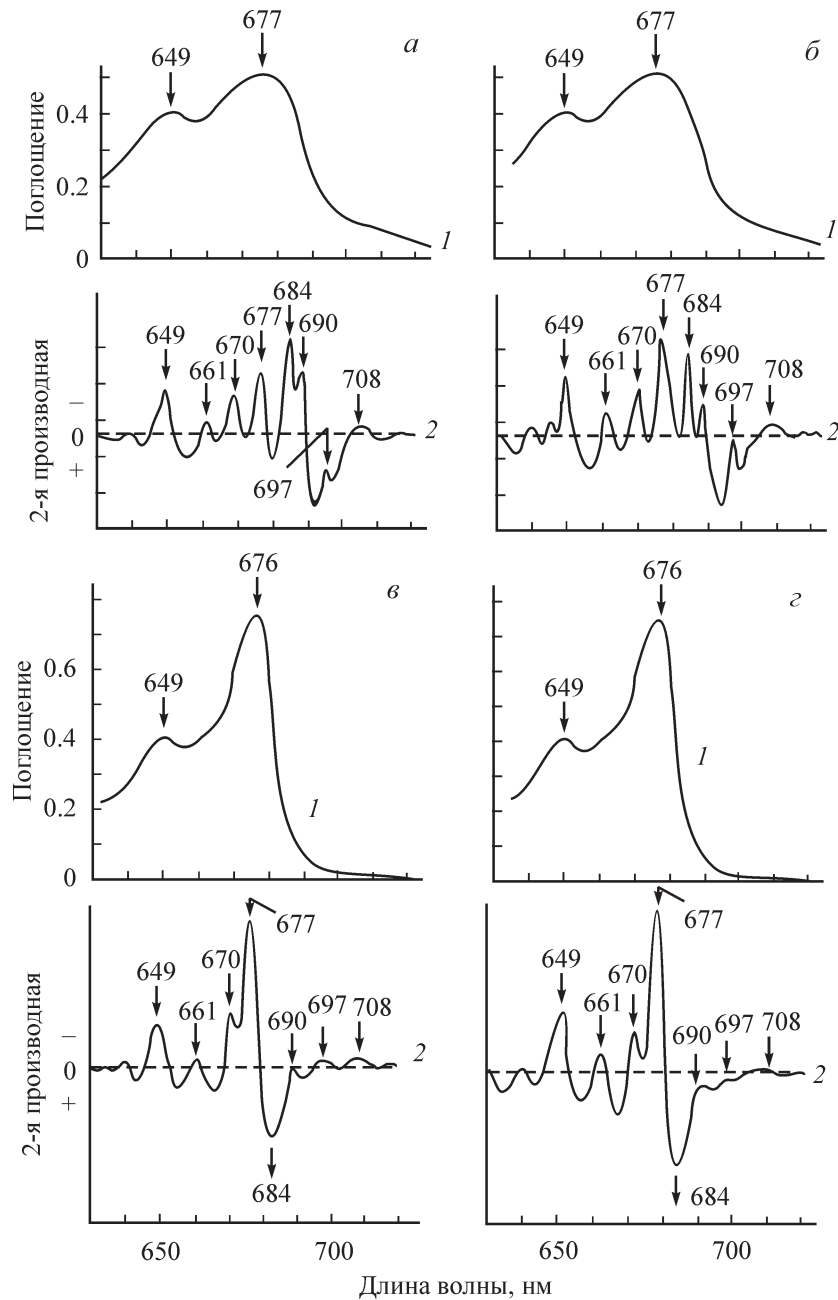


Рис. 5. Низкотемпературные спектры поглощения хлорофилла (1) и их вторые производные (2) семядольных листьев проростков хлопчатника родительского типа и мутанта *xantha-702*, росших 4 сут в темноте и 1 сут на свету (а, в), а также росших 4 сут в темноте и 5 сут на свету (б, г).

Показано, что у мутанта отсутствует полоса поглощения при 684 нм, принадлежащая ФС-II, и редуцированы полосы при 690, 697 и 708 нм, принадлежащие ФС-I.

вместное свечение полос при 728 и 720 нм комплексов ФС-I в нативных хлоропластах обуславливает полосу излучения при 733 нм (Лебедев и др., 1985, 1988, 1991; Ладыгин, 1998).

Исследование низкотемпературных спектров флуоресценции хлорофилла в семядольных листьях проростков, росших 4—8 сут в темноте, а затем в течение 1 и 5 сут на свету, показало, что в листьях родительского типа легко выявляются все три основных максимума при 686, 695 и 733 нм (рис. 6), в то время как в листьях мутанта *xantha-702* отсутствовали максимумы флуоресценции хлорофилла при 686 и 695 нм. Как правило, у мутан-

тов это связано с потерей антенных форм хлорофилла и отсутствием функциональной активности реакционного центра ФС-II (Ладыгин, 1985). Наличие в спектрах флуоресценции хлорофилла мутанта *xantha-702* длинноволнового максимума при 728 нм указывает на способность хлоропластов листьев к формированию светособирающего хлорофилл-*a/b*-белкового комплекса ФС-I, хотя, вероятно, в значительно меньшем количестве. Смещение положения длинноволнового максимума флуоресценции от 733 до 728 нм в листьях мутанта *xantha-702* обусловлено, скорее всего, очень низким содержанием или отсутствием хлорофилл-*a*-белкового комплекса реакцион-

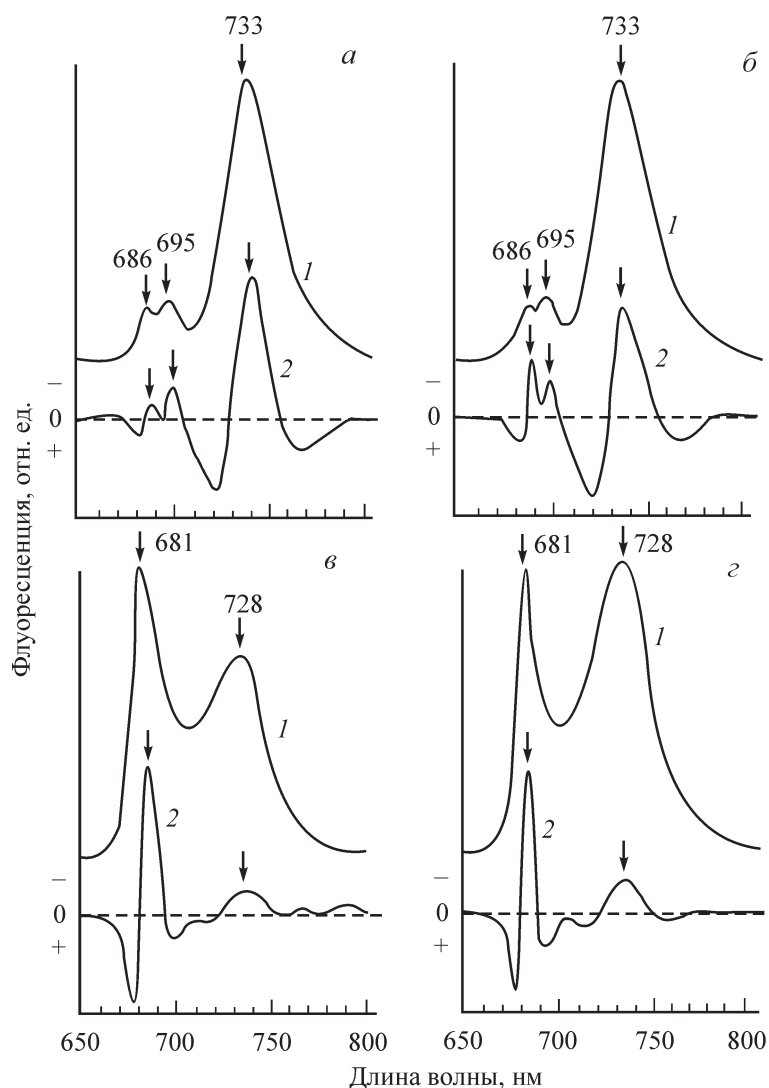


Рис. 6. Низкотемпературные спектры флуоресценции хлорофилла (1) и их вторые производные (2) семядольных листьев проростков хлопчатника родительского типа и мутанта *xantha-702*, росших 4 сут в темноте и 1 сут на свету (а, в), а также росших 4 сут в темноте и 5 сут на свету (б, г).

Показано, что у мутанта сохраняются только светособирающие комплексы ФС-II (полоса при 681 нм) и ФС-I (полоса при 728 нм).

ного центра ФС-I с полосой свечения при 720 нм. Поэтому мы видим свечение полосы при 728 нм, принадлежащей только ЛНС-I-светособирающему комплексу ФС-I (Ладыгин, Вайшла, 2005).

Активность ФС-I и ФС-II. Изучение фотохимической активности ФС-II (рис. 7) подтверждает вывод, сделанный нами на основании спектральных характеристик, об отсутствии сформированного комплекса ФС-II в хлоропластах мутанта *xantha-702* как в темноте, так и на свету и неспособности его к фотосинтезу. В то же время листья родительского типа хлопчатника на свету выделяют O_2 с высокой скоростью (рис. 7). В кинетике выделения O_2 после включения света присутствует быстрая фаза, обычно наблюдаемая у клеток водорослей. Быстрая фаза обусловлена восстановлением пластохинонного пула ФС-II электронами от воды, а последующие — фаза поглощения O_2 и фаза нарастания скорости выделения O_2 — связаны с процессом фиксации CO_2 (Ладыгин и др., 1988). Листья мутанта не выделяют O_2 на свету. Напротив, после включения света наблюдается его поглощение. Реакция

поглощения O_2 на свету в хлоропластах проходит обычно по типу реакции Мелера (Эдвардс, Уокер, 1986). Отсутствие выделения O_2 в листьях мутанта *xantha-702* может иметь две причины. Во-первых, возможно, у них не функционирует Mn-содержащий водоокисляющий комплекс ФС-II. Во-вторых, у листьев мутантных растений *xantha-702* может отсутствовать сформированный реакционный центр ФС-II. Для выяснения этого вопроса мы исследовали возможность функционирования реакционного центра ФС-II с помощью измерения долгоживущей замедленной люминесценции.

Анализ длительного послесвечения хлорофилла зеленых семядольных листьев световых проростков родительского типа показал высокую активность разделения зарядов в ФС-II после 1, 2, 3 и 4 последовательных вспышек (рис. 8). При этом последовательно возникают различные состояния водоокисляющего комплекса и реакционного центра ФС-II (Velthuys, Kok, 1978).

Послесвечение хлорофилла желтых семядольных листьев 1-суточных световых проростков мутанта *xant-*

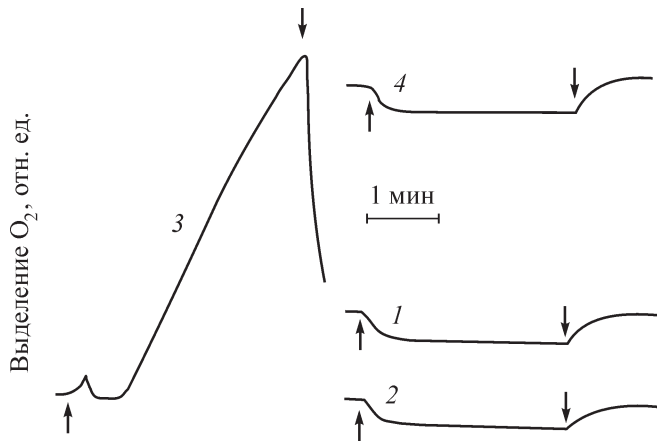


Рис. 7. Кинетика выделения O_2 семядольными листьями проростков хлопчатника родительского типа и мутанта *xantha-702*, росших 4 сут в темноте (1, 2) и 5 сут на свету (3, 4).

Показано восстановление способности к выделению O_2 на свету только в листьях родительского типа (3). Стрелки вверх и вниз обозначают включение и выключение света соответственно.

ha-702 имело интенсивность в 100—110 раз меньше, чем семядольных листьев родительского типа. Из этого факта можно заключить, что концентрация реакционных центров ФС-II в хлоропластах мутанта крайне мала. У желтых семядольных листьев мутанта *xantha-702* после 5 сут освещения интенсивность послесвечения хлорофилла приближалась к нулю, причем полностью исчезала минутная компонента замедленной люминесценции. Эти данные указывают на практически полное отсутствие комплексов реакционных центров ФС-II в листьях мутанта *xantha-702* как в темноте, так и на свету.

Сопоставление результатов по измерению выделения O_2 и послесвечения в семядольных листьях родительского типа и мутанта *xantha-702* показало, что в ре-

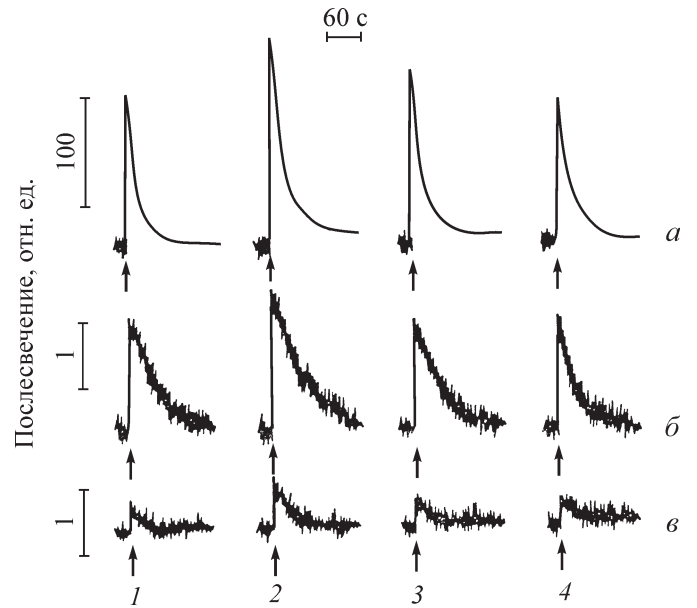


Рис. 8. Кинетика длительного послесвечения хлорофилла при освещении четырьмя одиночными вспышками света (1—4) семядольных листьев проростков хлопчатника родительского типа (а) и мутанта *xantha-702*, росших 4 сут в темноте и в течение 1 (б) и 5 (а, в) сут на свету.

Показано снижение фотохимической активности ФС-II у мутанта (б, в) более чем в 100 раз по сравнению с контролем (а). Стрелками указаны моменты вспышек света.

зультате мутации гена *xan* водоокисляющий комплекс и реакционные центры ФС-II утратили способность функционировать. Методом электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) ранее было показано, что у мутанта *xantha-702* нет активности P_{700} и не формируется комплекс реакционного центра ФС-I (Наджимов и др., 1985).

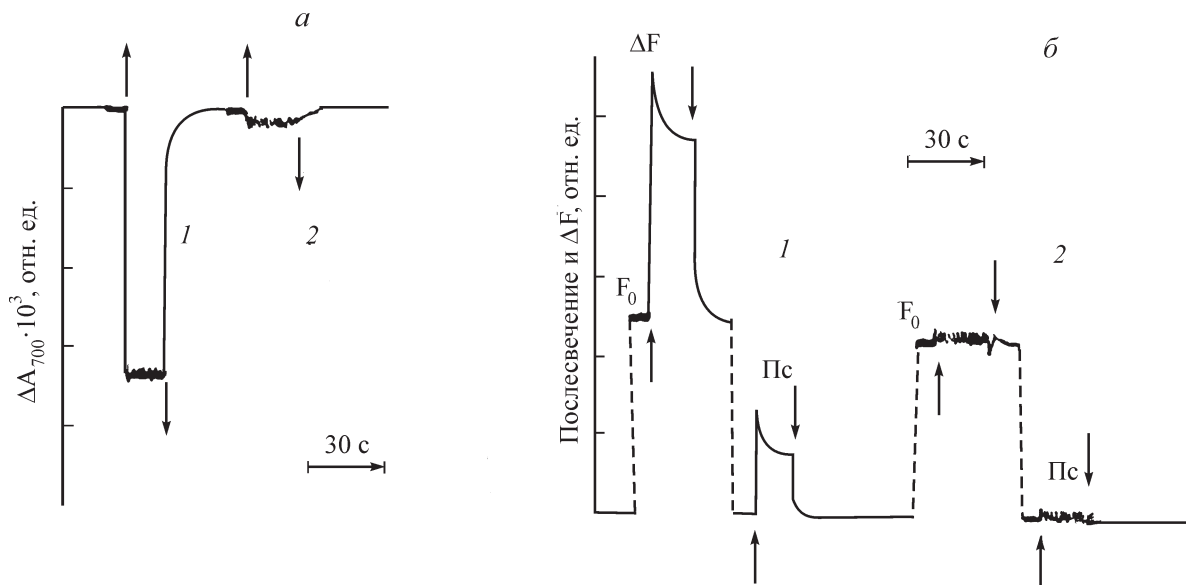


Рис. 9. Светоиндуцированные изменения поглощения хлорофилла P_{700} (ΔA_{700}) реакционного центра ФС-I при 700 нм (а), а также переменной флуоресценции (ΔF) и послесвечения (Пс) хлорофилла реакционного центра ФС-II семядольных листьев проростков хлопчатника, росших 4 сут в темноте и 5 сут на свету.

Показано отсутствие активности реакционных центров ФС-I (а) и ФС-II (б). Стрелки вверх и вниз обозначают включение и выключение света соответственно.

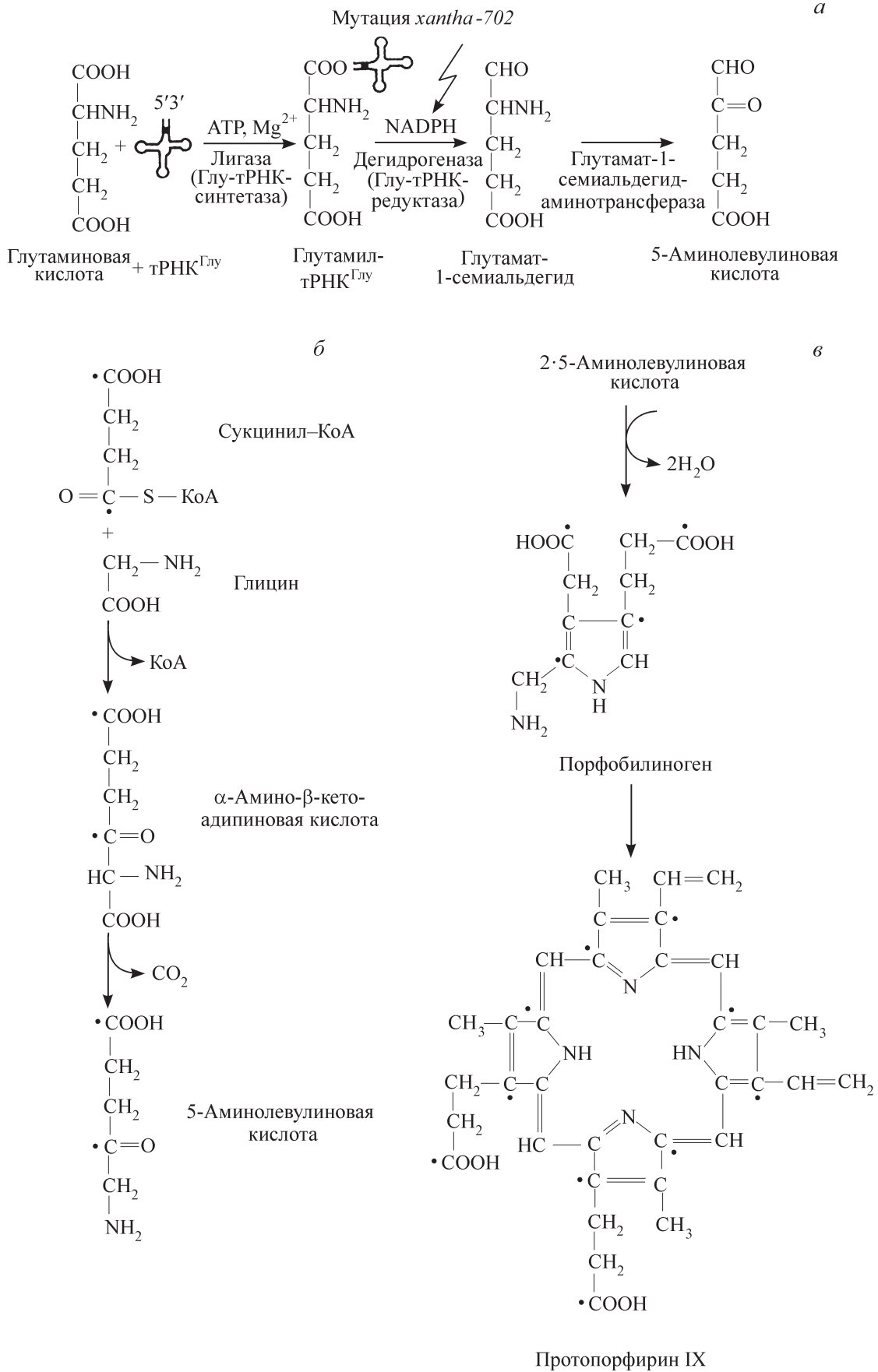


Рис. 10. Схема цепи биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты по C₅-пути (а) и C₄₊₁-пути (б) и ее последующих превращений до протопорфирина IX (в).

Стрелкой показано возможное место генетической блокировки ее у мутанта *xantha-702*.

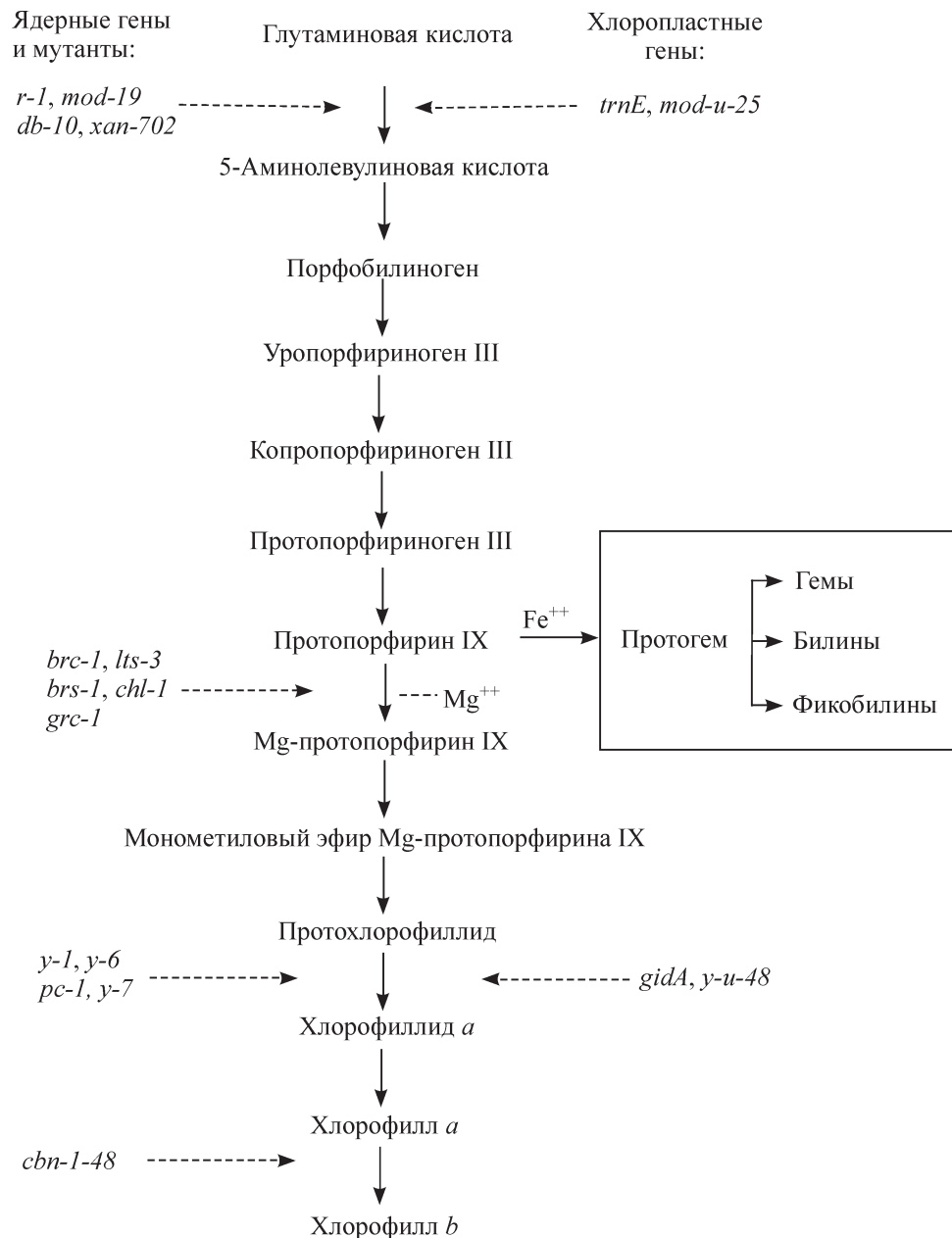


Рис. 11. Схема цепи биосинтеза хлорофилла в хлоропластах растений и водорослей, показывающая известные мутанты и гены, блокирующие различные ее этапы, в том числе ген *xan-702* у мутанта хлопчатника.

Использованы следующие данные: Wang et al., 1975, 1984; Чунаев и др., 1981, 1984; Чунаев, 1994; Scheer, 2003.

Мы также исследовали фотохимическую активность реакционных центров ФС-I и ФС-II. Кинетики светоиндуцированных изменений поглощения хлорофилла при 700 нм (ΔA_{700}), характеризующие наличие реакционных центров P_{700} ФС-I (рис. 9, *a*), не выявили активности ФС-I. Аналогичные результаты были получены при изучении светоиндуцированных изменений переменной флуоресценции хлорофилла (ΔF) и послесвечения, характеризующих активность реакционных центров ФС-II (рис. 9, *б*). Установлено, что у мутанта *xantha-702* нет активных реакционных центров ФС-I и ФС-II. Эти данные согласуются с полученными ранее методом ЭПР результатами для ФС-I (Наджимов и др., 1985) и по выделению O_2 для ФС-II (Ладыгин и др., 1994). Все вышесказанное

позволяет заключить, что у мутанта *xantha-702* нет ни хлорофилл-*a*-белковых комплексов, ни активных реакционных центров ФС-I и ФС-II. Следовательно, в пластидах мутанта образуются только светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы I и II.

В ранее проведенных исследованиях было сделано несколько предположений о том, что данная мутация может быть связана с нарушением фитохрома (Аверина и др., 1994). Возможно также, что у мутанта *xantha-702* генетически нарушена световая стадия биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты либо синтез одного из апопротеинов пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата (Аверина и др., 1992, 1994). Следует, однако, отметить, что в последнем случае отсутствие одного из

пигмент-белковых комплексов не могло бы так драматически сказаться на общем содержании хлорофилла в листьях мутанта *xantha-702* до уровня 2—5 % (Ладыгин, 1998). Мы полагаем, что регуляторная роль фитохрома в данном случае тоже кажется маловероятной (Наджимов и др., 1985; Аверина и др., 1994).

Полученные в нашей работе результаты показали, что общее содержание хлорофилла на свету в листьях мутанта *xantha-702* было снижено более чем в 30 раз по сравнению с его содержанием в листьях проростков родительского типа (табл. 1). Соотношение хлорофиллов *a/b*, близкое к единице в листьях мутанта, свидетельствует о наличии у него только светособирающих комплексов I и II. Уменьшение содержания хлорофилла и редукция мембранной системы хлоропластов у мутанта на свету, на наш взгляд, обусловлены блокировкой светового синтеза 5-аминолевулиновой кислоты. В результате в онтогенезе листа доля хлорофилла на единицу массы и на хлоропласт уменьшается, а в некоторых хлоропластах она приближается к нулю. Следовательно, первопричиной наблюдаемых изменений в листьях мутанта является блокировка ядерным геном *xan* цепи биосинтеза хлорофилла.

Редукция пигмент-белковых комплексов ФС-I и ФС-II обусловлена очень малым количеством хлорофилла, что приводит лишь к зачаточному формированию мембранной системы подобно этиопластам темновых проростков пшеницы (Dahlin et al., 1983). Тот факт, что синтезирующийся хлорофилл сразу же участвует в формировании светособирающих комплексов I и II, означает, что мутация *xantha-702* не нарушает механизм формирования мембранных структур. Слабым развитием пигмент-белковых комплексов ФС-I и ФС-II в тилакоидах можно объяснить неспособность ФС-II в листьях мутанта хлопчатника окислять H₂O и выделять O₂, а также отсутствие фотохимической активности реакционных центров ФС-I и ФС-II. Для нормального функционирования фотосистем необходимо наличие тилакоидов и образование гран, которых у мутанта *xantha-702* нет. Известно, что именно в зонах контакта тилакоидов гран формируются ФС-II и связанный с ней комплекс фотоокисления воды (Anderson, Melis, 1983; Anderson, 1986, 1999; Albertsson, 1995, 2001; Ладыгин, 1998, 2005).

Что же касается идентификации места нарушения мутацией *xantha-702* процесса биосинтеза хлорофилла, то на основании ранее полученных результатов (Аверина и др., 1992; Шегай, 1993) и описанных в настоящей статье можно считать, что дефицит хлорофилла у него связан с нарушением процесса биосинтеза ранних предшественников молекул 5-аминолевулиновой кислоты на свету, скорее всего, на этапе образования глутамат-1-семиальдегида (рис. 10), подобно мутантам *Arabidopsis thaliana* (Runge et al., 1995) и *Chlamydomonas reinhardtii* (Чунаев, 1994).

Таким образом, проведенные нами исследования четко показали, что мутация *xantha-702* затрагивает процесс биосинтеза хлорофилла (рис. 11) на его самых ранних этапах (Ленинджер, 1974; Аверина, 1988, 1998; Scherer, 2003), а именно связанных со светозависимым образованием молекул 5-аминолевулиновой кислоты. При этом мутантный ядерный ген *xan* не оказывает какого-либо воздействия на ферментные системы последующих этапов превращения ее в хлорофилл (рис. 11). В цепи биосинтеза хлорофилла (рис. 11) ген *xan-702* может быть локализован наряду с другими генами, блокирующими различные этапы цепи биосинтеза хлорофил-

ла, например обнаруженными у мутантов *C. reinhardtii* (Wang et al., 1975, 1984; Чунаев и др., 1981, 1984; Чунаев, 1994; Аверина, 1998).

Список литературы

- Аверина Н. Г. 1988. Регуляция биосинтеза хлорофилла. В кн.: Биогенез пигментного аппарата фотосинтеза / Под ред. Ф. Ф. Литвина. Минск: Наука и техника. 110—142.
- Аверина Н. Г. 1998. Механизмы регуляции и внутрипластидная локализация биосинтеза хлорофилла. Биол. мембраны. 15 (5) : 504—516.
- Аверина Н. Г., Шегай И. Д., Кефели В. И., Коф Э. М. 1992. Биосинтез хлорофилла в семядольных листьях мутанта хлопчатника, дефицитного по хлорофиллу. Физиол. раст. 39 (1) : 85—92.
- Аверина Н. Г., Шегай И. Д., Кефели В. И., Мусаев Д. А. 1994. Анализ содержания фитохрома в этиолированных семядольных листьях мутанта хлопчатника, дефицитного по хлорофиллу. Физиол. биохим. культ. раст. 26 (1) : 22—25.
- Гостимский С. А., Кренделева Т. Е., Кухарский Г. П., Низовская Н. В., Храмова Г. А. 1991. Характеристика фотосинтетического аппарата жизнеспособных хлорофильных мутантов гороха. Физиол. раст. 38 (1) : 31—37.
- Ладыгин В. Г. 1979. Спектральные формы хлорофилла мутантов *Chlamydomonas* с неактивными фотосистемами. Биофизика. 24 (2) : 254—259.
- Ладыгин В. Г. 1985. Спектральные свойства хлорофилл-*a*-белкового комплекса фотосистемы 2 в нативном состоянии. Физиол. раст. 32 (5) : 851—859.
- Ладыгин В. Г. 1998. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii*. Физиол. раст. 45 (5) : 741—762.
- Ладыгин В. Г. 2005. Фотохимическая активность, спектральные свойства и структура хлоропластов листьев *Pisum sativum* при дефиците железа и анаэробнозе корней. Биофизика. 50 (1) : 86—100.
- Ладыгин В. Г., Агрикова И. М. 1983. Структурная организация хлоропластов у аллельных хлорофилл-*b*-дефицитных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Цитология. 25 (11) : 1231—1235.
- Ладыгин В. Г., Аллахвердиев С. И., Ананьев Г. М., Климов В. В., Мальцев С. В. 1988. Функциональная характеристика ФС-II мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, не содержащих светособирающего комплекса и ФС-I. Физиол. раст. 35 (1) : 14—23.
- Ладыгин В. Г., Аллахвердиев С. И., Четвериков А. Г. 1990. Влияние редукции светособирающего комплекса на величину фотосинтетической единицы и число реакционных центров фотосистем у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Биофизика. 35 (2) : 280—284.
- Ладыгин В. Г., Вайшля О. Б. 2005. Спектральные свойства и число реакционных центров фотосистем у хлорофилл-дефицитных мутантов *Pisum sativum* L. Физиол. раст. 52 (2) : 172—183.
- Ладыгин В. Г., Вайшля О. Б., Семенова Г. А. 2003. Ультраструктурная организация хлоропластов *chlortica*-мутантов *Pisum sativum* L. Цитология. 45 (7) : 668—677.
- Ладыгин В. Г., Лебедев Н. Н. 1986. Спектры флуоресценции хлорофилла ФС-I, ФС-II и светособирающего комплекса *Chlamydomonas reinhardtii*. Молекуляр. биол. 20 (2) : 407—414.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А. 1993. Влияние дефицита железа на состав хлорофилл-белковых комплексов и ультраструктуру хлоропластов гороха. Физиол. раст. 40 (6) : 841—849.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тагеева С. В. 1972. Ультраструктура пластид белого и желтого мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Цитология. 14 (12) : 1455—1460.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тагеева С. В. 1973. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Цитология. 15 (7) : 810—817.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тагеева С. В. 1978. Вариабельность в накоплении пигментов и структурной организации

- хлоропластов у рекомбинантов фенотипически желтого мутанта Ж-4 *Chlamydomonas reinhardtii*. Цитология. 20 (9) : 998—1004.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тагеева С. В. 1980. Фотохимические свойства и структура мембран хлоропластов гибридного штамма *Chlamydomonas* с неактивными ФС-I и ФС-II. Физиол. раст. 27 (1) : 91—97.
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Чемерилов В. И., Квитко К. В., Столбова А. В., Тагеева С. В., Ирошичкова Г. А. 1982. Варибельность структурной организации хлоропластов у аллельных светочувствительных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Цитология. 24 (4) : 391—399.
- Ладыгин В. Г., Шегай И. Д., Ананьев Г. М., Кефели В. И. 1994. Спектральные свойства и фотохимическая активность *xantha*-мутанта хлопчатника. Физиол. раст. 41 (1) : 10—16.
- Лебедев Н. Н., Ладыгин В. Г., Джелепова И. Д., Хатыпов Р. А. 1988. Спектральные характеристики и время жизни флуоресценции компонентов светособирающего комплекса в клетках мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Биофизика. 33 (6) : 978—983.
- Лебедев Н. Н., Тан Цзунчин, Джелепова И. Д., Ладыгин В. Г. 1991. Спектры флуоресценции изолированных пигмент-белковых компонентов мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Молекуляр. биол. 25 (1) : 43—53.
- Лебедев Н. Н., Шиффел П., Красновский А. А. 1985. Спектральные характеристики флуоресценции протохлорофиллида и хлорофилла *b* в зеленеющих и изолированных хлоропластах. Биофизика. 30 (1) : 44—51.
- Ленинджер А. 1974. Биохимия. М.: Мир. 957 с.
- Наджимов У. К., Кефели В. И., Поляков А. С., Мусавев Д. У., Четвериков А. Г. 1985. Возможность исключения фотосинтеза на ранних этапах роста и морфогенеза проростков хлопчатника. Изв. АН СССР. Сер. биол. 1 : 90—95.
- Найлэн Р. А. 1967. Природа индуцированных мутаций у высших растений. Генетика. 3 : 3—22.
- Насыров Ю. С. 1975. Фотосинтез и генетика хлоропластов. М.: Наука. 144 с.
- Санамьян М. Ф. 2003. Цитогенетический эффект обработки семян хлопчатника тепловыми нейтронами. Цитология. 3 : 49—54.
- Семенова Г. А., Ладыгин В. Г. 1975. Ультраструктура пластид трех типов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, фенотипически желтых на свету или в темноте. Цитология. 17 (9) : 1003—1008.
- Семенова Г. А., Ладыгин В. Г., Тагеева С. В. 1977. Ультраструктурная организация мембранной системы хлоропластов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с неактивными фотосистемами. Физиол. раст. 24 (1) : 18—22.
- Усатов А. В., Рассадина В. В., Аверина Н. Г., Лежнева Л. А., Дудко Ю. С., Машкина Е. В., Прихоженко Э. Я., Колоколова Н. С. 2004. Структурно-функциональные особенности мутантных пластид внеядерных пестролистных форм подсолнечника. Физиол. раст. 51 (2) : 175—183.
- Чунаев А. С. 1994. Генетический контроль биосинтеза хлоропластных пигментов у *Chlamydomonas reinhardtii*. Генетика. 30 (8) : 1075—1084.
- Чунаев А. С., Ладыгин В. Г., Гавриленко Т. А., Крзла Л. П., Корнюшенко Г. А. 1981. Наследование признака отсутствие хлорофилла *b* и изменчивость светособирающего комплекса в мейотическом потомстве мутанта С-48 *Chlamydomonas reinhardtii*. Генетика. 17 (11) : 2013—2024.
- Чунаев А. С., Ладыгин В. Г., Мирная О. Н., Семенов Е. П., Гаевский Н. А., Болдина О. Н. 1984. Множественный аллелизм в гене *cbp-1*, контролирующем накопление хлорофилла *b* у *Chlamydomonas reinhardtii*. Генетика. 20 (5) : 775—781.
- Шегай И. Д. 1993. Биогенез пигментов фотосинтетического аппарата в мутанте хлопчатника типа «*xantha*»: Дис.... канд. биол. наук. Пушино: ИФПБ РАН. 138 с.
- Шлык А. А. 1971. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. В кн.: Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О. А. Павлиновой. М.: Наука. 154—170.
- Эдвардс Дж., Уокер Д. 1986. Фотосинтез С₃- и С₄-растений: механизмы регуляции. М.: Мир. 290 с.
- Albertsson P.-A. 1995. The structure and function of the chloroplast membrane — a model for the domain organization. Photosynth. Res. 46 : 141—149.
- Albertsson P.-A. 2001. Quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. Trends Plant Sci. 6 : 359—358.
- Anderson J. M. 1986. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. Ann. Rev. Plant Physiol. 37 : 93—136.
- Anderson J. M. 1999. Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. Austr. J. Plant Physiol. 26 : 625—639.
- Anderson J. M., Melis A. 1983. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80 : 745—752.
- Axelsson L. 1981. The photostability of different chlorophyll forms in dark grown leaves of wheat. V. Accumulation of protochlorophyllide after photocomposition of chlorophyllide. Physiol. Plant. 53 : 131—138.
- Babiychuk E., Muller F., Eubel H., Braun Y.-P., Fretszén M., Kushnir C. 2003. *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. Plant J. 33 : 899—909.
- Chen J., Wang J., Rudan X., Li L., Gong Y., Zhao N., Kuang T. 2001. Changes of absorption spectra during heat-induced denaturation of photosystem II core antenna complexes CP₄₃ and CP₄₇: redefining the binding states of chlorophyll molecules in these two complexes. Biochim. biophys. acta. 1504 : 396—408.
- Cunningham F. X., Gantt E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopenes ϵ -cyclases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 2905—2910.
- Dahlin C., Ryberg H., Axelsson L. 1983. A possible structural role for carotenoids and carotenoid precursors in etioplasts. Physiol. Plant. 59 : 562—566.
- Dekker J. P., Hassoldt A., Pettersson A., Van Roon., Groot M.-L., Van Grondelle R. 1995. On the nature of the F₆₉₅ and F₆₈₅ emission of photosystem II. In: Photosynthesis: Light to Biosphere. (Ed. P. Mathis). Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 1 : 53—56.
- Eskins K., Delmastro D., Harris L. A. 1983. Comparison of pigment-protein complexes among normal, chlorophyll-deficient and senescent soybean genotypes. Plant Physiol. 73 : 514.
- Falbel T. G., Meehl J. B., Staehelin L. A. 1996. Severity of mutant phenotype in a series of chlorophyll-deficient wheat mutants depends on light intensity and the severity of the block in chlorophyll synthesis. Plant Physiol. 112 : 821—832.
- Falbel T. G., Staehelin L. A. 1996. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: a common feature of chlorophyll *b*-deficient mutants. Physiol. Plant. 97 : 311—320.
- Falbel T. G., Staehelin L. A., Adams W. W., III. 1994. Analysis of xanthophyll cycle carotenoids and chlorophyll fluorescence in light intensity-dependent chlorophyll-deficient mutants of wheat and barley. Photosynth. Res. 42 : 191—202.
- Gottschalk W. 1964. Die wirkung mutierter gene und morphologie und function pflanzliche organe. Jena: VEB Gustav Fisher Verlag. 182 S.
- Harris E. H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52 : 363—406.
- Harrison M. A., Nemson J. A., Melis A. 1993. Assembly and composition of the chlorophyll *a*—*b* light harvesting complex of barley: immunochemical analysis of chlorophyll *b*-less and chlorophyll *b*-deficient mutants. Photosynth. Res. 38 : 141—151.
- Henningsen K. W., Boynton J. E., von Wettstein D. 1993. Mutants at *xantha* and *albina* loci in relation to chloroplast biogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter. 42 : 1—350.
- Jansson S. 1994. The light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins. Biochim. biophys. acta. 1184 : 1—19.
- Jansson S., Pichersky E., Bassi R., Green B. R., Ikeuchi M., Melis A., Simpson D. J., Spangfort M., Thornber J. P. 1992. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. Rep. 10 : 242—253.

- Kohen R. J. 1983. Genetic analysis of virescent mutants in *Gossypium hirsutum* L. Crop. Sci. 23 : 289—297.
- Krol M., Spangfort M. D., Huner N. P. A., Oquist G., Gustafsson P., Jansson S. 1995. Chlorophyll *a/b* binding proteins, pigment conversions and early light induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant. Plant Physiol. 107 : 873—883.
- Ladygin V. G., Bil' K. Ya. 1981. Chlorophyll form of 684 nm as antenna of photosystem II in chloroplast of C₄-plant leaves. Photosynthetica. 15 : 49—54.
- Lebedev N. N., Khatypov R. A., Ladygin V. G. 1988. Fluorescence excitation spectra and decay kinetics of light-harvesting complex in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants. Photosynthetica. 22 : 364—370.
- Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148 : 350—382.
- Miller G. W., Denney A., Wood J. K., Welkie G. W. 1979. Light-induced 5-aminolevulinic acid I dark growth barley seedlings. Plant Cell Physiol. 20 : 131—143.
- Mouzerall D., Granick S. 1956. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J. Biol. Chem. 219 : 435—446.
- Murray D. L., Kohorn B. D. 1991. Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* homozygous for the *chl-1* locus lack chlorophyll *b*, lack stable LHCPII and have stacked thylakoids. Plant Mol. Biol. 16 : 71—79.
- Nilan R. A. 1964. The cytology and genetic of barley. Washington: Univ. Press. 207 p.
- Pogson B. J., Niyogi K. K., Bjorkman O., DellaPenna D. 1998. Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 13 324—13 329.
- Prina A. R., Arias M. C., Lainez V., Landau A., Maldonado S. 2003. A cytoplasmically inherited mutant controlling early chloroplast development in barley seedlings. Theor. Appl. Genet. 107 : 1410—1418.
- Ruban A. V., Wentworth M., Yakushevskaya A. E., Andersson J., Lee P. J., Keegstra W., Dekker J. P., Bockema E. J., Jansson S., Horton P. 2003. Plant lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. Nature. 421 : 648—652.
- Runge S., van Cleve B., Lebedev N., Armstrong G., Apel K. 1995. Isolation and classification of chlorophyll-deficient *xantha* mutants of *Arabidopsis thaliana*. Planta. 197 : 490—500.
- Scheer H. 2003. The pigments. In: Light-harvesting antennas in photosynthesis. (Eds. B. R. Green, W. W. Parson). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ. 29—81.
- Shlyk A. A., Averina N. G., Shalygo N. V. 1982. Metabolism and intermembrane location of magnesium protoporphyrin IX monomethyl ester in centers of chlorophyll biosynthesis. Photobiocchem. Photobiophys. 2 (4/5) : 197—204.
- Tanaka A., Ito H., Tanaka R., Tanaka N. K., Yoshida K., Okada K. 1998. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 12 719—12 723.
- Tanaka A., Tanaka Y., Tsuji H. 1994. Preferential accumulation of apoproteins of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein in greening barley leaves treated with 5-aminolevulinic acid. Planta. 192 : 92—97.
- Tanaka Y., Tanaka A., Tsuji H. 1993. Effects of 5-aminolevulinic acid on the accumulation of chlorophyll *b* and apoproteins of the light harvesting chlorophyll *a/b* protein complex of photosystem II. Plant Cell Physiol. 34 : 465—472.
- Terao Y., Yamashita A., Katoh S. 1985. Chlorophyll-*b*-deficient mutants of rice. II. Antenna chlorophyll *a/b* protein of photosystem I and II. Plant Cell Physiol. 26 : 1369—1376.
- Velthuys B., Kok B. 1978. Photosynthetic oxygen evolution from hydrogen peroxide. Biochim. biophys. acta. 502 : 211—218.
- Wang W. Y., Boynton J. E. 1975. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: analysis of a mutant affecting synthesis of 5-aminolevulinic acid. Cell. 6 : 75—87.
- Wang W.-Y., Huang D.-D., Stachon D. 1984. Purification, characterization and fraction of the 5-aminolevulinic acid synthesizing enzymes from light-grown *Chlamydomonas reinhardtii* cells. Plant Physiol. 74 : 569—575.
- Zuber H. 1985. Structure and function of light harvesting complexes and their polypeptides. Photochem. Photobiol. 42 : 281—285.

Поступила 12 V 2005

STRUCTURAL-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF CHLOROPLASTS IN LEAVES
OF *XANTHA-702* MUTANT OF *GOSSYPIUM HIRSUTUM* L.

V. G. Ladygin,¹ G. A. Semenova,² I. D. Shegay¹

¹ Institute of Basic Biological Problems RAS, and ² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, 142290; e-mail: ladyginv@rambler.ru

For cotton mutant *xantha* (*Gossypium hirsutum* L.), it has been established that synthesis of 5-aminolevulinic acid was blocked in the light. In the light this mutant accumulates chlorophyll by 30 times lower as compared to the parent type. In mutant *xantha*, a very few pigment-protein complexes of PS-I and PS-II are formed in chloroplasts, and formation of membrane system in these is blocked at the early stages, in most cases, at the stage of bubbles and single short thylakoids. Functional activity of reaction centers of PS-I and PS-II is close to zero. Only light-harvesting chlorophyll-*a/b* protein complexes of the two photosystems are formed in mutant *xantha* plastid membranes with maximum chlorophyll fluorescence at 728 and 681 nm, respectively. It has been concluded that in mutant *xantha* genetic block of 5-aminolevulinic acid biosynthesis in the light disturbs the formation and functioning of the complexes of reaction centers of PS-I and PS-II, hindering the development of the whole membrane system in chloroplasts, causing a sharp decrease in productivity.