

УДК 581

**ПИГМЕНТНЫЕ МУТАНТЫ ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ  
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*: ИЗУЧЕНИЕ ИХ  
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СОСТОЯНИЯ  
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА**

**А. К. Садвакасова<sup>1</sup>, Н. Р. Акмуханова<sup>1</sup>, Б. К. Заядан<sup>1</sup>, Д. Н.  
Маторин<sup>2</sup>, Ф. Ф. Протопопов<sup>2,3</sup>, А. А. Алексеев<sup>3</sup>, К.  
Болатхан<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы,  
Республика Казахстан

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г.

Якутск

Поступила в редакцию

Методом индуцированного мутагенеза получены пигментные мутанты зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124y-1, CC-124y-2 и CC-124p-2. Изучены их морфологические свойства и активность фотосинтетического аппарата. Показано уменьшение содержания хлорофилла *b* и каротиноидов. Анализ индукционных кривых флуоресценции показал уменьшение электронного транспорта в ФС2, увеличение доли Q<sub>v</sub>-невосстанавливающих центров и увеличение нефотохимического тушения флуоресценции. Обнаружено отсутствие прямого действия мутаций на реакции окисления пигмента ФС1 – P<sub>700</sub> и уменьшение замедленной флуоресценции. Предлагается использовать параметры индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции для раннего обнаружения появления мутагенного эффекта при действии УФ. Полученные пигментные мутанты могут быть применены в биомониторинговых исследованиях.

*Ключевые слова:* *Chlamydomonas reinhardtii*, флуоресценция хлорофилла *a*, замедленная флуоресценция, ЛП-тест, фотосинтез.

-----  
*Сокращения:* ЗФ – замедленная флуоресценция; РЦ – реакционный центр; ФНР – ферредоксин-НАДФ-редуктаза; P<sub>700</sub> – пигмент РЦ ФС1; PQ – пластохинон; Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> – первичный и вторичный хинонные акцепторы электрона; O, J, I, P – промежуточные стадии в светоиндуцированной кривой флуоресценции.

*Адрес для корреспонденции:* Садвакасова Асем, Республика Казахстан, 050040, г.

Алматы, ул. Тимирязева 71, КазНУ имени аль-Фараби, факультет биологии и биотехнологии, корпус 6.

Электронная почта: [sadvakasova1979@mail.ru](mailto:sadvakasova1979@mail.ru)

## ВВЕДЕНИЕ

Основным современным направлением развития биомониторинга является использование различных тест-объектов в биотестировании. Биотестирование, используемое в качестве экспресс-метода оценки токсичности водной среды, дает возможность охарактеризовать уровень токсичности среды для организмов, а также на основе оценки стабильности генетического материала под воздействием антропогенной нагрузки выявляет в окружающей среде мутагенные факторы, своевременное обнаружение которых позволяет принять меры по снижению их негативного действия на живые организмы [1]. Методологической основой современного генетического мониторинга является создание быстрых и эффективных тест-систем, позволяющих оценивать различные нарушения генетического аппарата, возникающие под действием факторов окружающей среды. В связи с этим поиск новых тестобъектов, перспективных для прогнозирования генетических последствий действия факторов окружающей среды и изучение их эколого-биологических особенностей представляется актуальным.

Удобными модельными объектами для изучения действия различных факторов (в т.ч. и мутагенных) на популяции и их влияние на активность фотосинтеза являются микроводоросли [2]. Зеленая одноклеточная водоросль хламидомонада (*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard) является модельным объектом в генетике, и изучение последствий действия мутагенных веществ на ее исходные и мутантные штаммы представляет интерес не только в плане расширения наших знаний о биологическом действии факторов, загрязняющих экосистемы, но и для создания тест-систем для генетического мониторинга объектов окружающей среды. Преимуществом использования пигментных мутантов в биотестировании водной среды является возможность определения не только токсичности загрязненной воды, но и ее потенциала мутагенности. Так, используя пигментный мутант, характеризующийся желтой окраской, при биотестировании исследуемой воды и регистрируя возникновение ревертантов зеленого цвета, характерного для исходного штамма, можно проводить оценку состояния водных экосистем на наличие мутагенов.

Целью данной работы являлось получение мутантных штаммов *Chl. reinhardtii*, их морфологическая характеристика и исследование возможности применения

спектральных и флуоресцентных методов для оценки состояния фотосинтетического аппарата водорослей на ранних стадиях мутационного процесса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения мутантов зеленой микроводоросли хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard) применяли ультрафиолетовое излучение длиной волны 254 нм (40 эрг/мм<sup>2</sup>). Для индукции мутаций клетки *Chl. reinhardtii* пятидневного возраста суспендировали в 7 мл воды. Суспензию выливали в стерильную чашку Петри, которую затем подвергали облучению УФ-светом и переносили на чашки Петри со средой L2-min [3]. Чашки Петри помещали в темноту на 24 часа для предотвращения фотореактивации [3]. Далее посеvy выставляли на свет (120 мкЕ/м<sup>2</sup>с) и через 10-14 дней учитывали результаты. Было проведено до десяти последовательных циклов селекции на искусственном свете, создаваемом кварцевыми галогеновыми лампами. Для генетических исследований хламидомонады использовали метод макроколоний и метод микроколоний [4].

Индукционные кривые быстрой флуоресценции (БФ) и замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла, а также окислительно-восстановительные превращения  $P_{700}$  измеряли с помощью прибора Multi-function Plant Efficiency Analyser (М-РЕА-2, Hansatech Instruments, Норфолк, Великобритания), который регистрировал все три параметра одновременно [5-7]. Регистрацию быстрой и замедленной флуоресценции производили при чередовании действующего красного света (интенсивность 1300 мкЕ/м<sup>2</sup>с, максимум в спектре излучения 627 нм) и темновых интервалов малой длительности, достаточной для регистрации ЗФ. Индукционную кинетику флуоресценции измеряли с максимальным временным разрешением 0.01 мс. Считается, что изменение поглощения при длине волны 820 нм отражает редокс-состояние  $P_{700}$ , реакционного центра ФС1. Значение интенсивности модулирующего света с пиком при длине волны 820±25 нм было выбрано 1000 мкЕ/м<sup>2</sup>с. Полученные данные отражения нормировались относительно значения отражения при t=0.7 мс (далее  $MR_0$ ) [6]. Общая продолжительность одного измерения составляла 60 с. Динамика ЗФ отражала изменения интенсивности свечения на шкале 0.1–0.9 мс в интервалах между импульсами действующего света. Характеристики и протокол измерений на приборе М-РЕА-2 были подробно описаны ранее [6, 8, 9].

Перед началом измерений образцы водорослей концентрировали на мембранном фильтре и выдерживали в темноте в течение 10 мин во влажном состоянии. Эти

условия подготовки образцов к регистрации параметров считали контрольными. Важно отметить, что анализатор M-PEA-2 оптимизирован для проведения измерений на листьях растений. В связи с высокой плотностью иммобилизованных клеток водорослей после их осаждения на фильтре соотношение сигнала к шуму в записях исследуемых параметров было не хуже, чем на листьях. Среднее содержание хлорофилла в клетках на фильтре составляло около  $400 \text{ мг/м}^2$ , что сопоставимо с его содержанием в листьях высших растений ( $\sim 500 \text{ мг/м}^2$ ) проведенное ранее [10]. Контрольные измерения флуоресценции в суспензиях *Scenedesmus quadricauda* в кюветах с помощью флуориметра Aqua-Pen-C AP-C 100 (“Photon Systems Instruments”, Брно, Чехия) показали, что применение процедуры обогащения проб на фильтре не оказывало влияния на физиологическое состояние клеток [9].

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе ОЖР параметров кинетической кривой, был использован так называемый JР-тест [5, 6, 11]. JР-тест включает в себя следующие параметры кинетической кривой индукции флуоресценции: (а) интенсивность флуоресценции при: 20 мкс ( $F_0$ ), 2 мс ( $F_J$ ), 30 мс ( $F_I$ ), 6 с ( $F_{6s}$ ), а также  $F_P$  ( $F_M$ ), максимальная интенсивность флуоресценции) и  $M_0$  (площадь над кинетической кривой ОЖР, ниже уровня  $F_M$ ).

Эти измеряемые величины использовали для расчета следующих параметров [5,6]:

$F_V = F_M - F_0$  – Максимальная переменная флуоресценция;

$F_V/F_M$  – Максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФС 2:  $F_V/F_M = \phi_{P_0} = TR_0/ABS$ ;

$V_J$  – Относительная переменная флуоресценция О-Ж фазы:  $V_J = (F_J - F_0)/F_V$ .  
Отражает долю  $Q_B$ –невосстанавливающих центров ФС2

$V_I$  – Относительная переменная флуоресценция J-I фазы, характеризует восстановленность пула хинонов, отражает способность ФС1 и ее акцепторов окислять PQH2:  $V_I = (F_I - F_0)/F_V$ ;

$\phi_{E_0}$  – Квантовая эффективность переноса электрона от  $Q_A^-$  (при  $t=0$ ):  
 $\phi_{E_0} = ET_0/ABS = (TR_0/ABS) * (ET_0/TR_0) = 1 - (F_0/F_M) * (1 - V_J)$ ;

$\phi_{D_0}$  – Квантовая эффективность рассеивания энергии:  $\phi_{D_0} = 1 - \phi_{P_0} = (F_0/F_M)$ ;

$ABS/RC$  – Поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром, характеризует относительный размер антенны:  $ABS/RC = (TR_0/RC)/(TR_0/ABS) = M_0/V_J(1/\phi_{P_0}) = (M_0/V_J)/[(F_M - F_0)/F_M]$ ;

$PI_{ABS}$  – Индекс производительности – показатель функциональной активности ФС2, отнесенный к поглощаемой энергии:  $PI_{ABS} = [1 - (F_0/F_M)] / (M_0/V_J) * [(F_M - F_0)/F_0] * [(1 -$

$V_J)/V_J]$ ;

$PI_{total}$  – Общий индекс производительности – показатель функциональной активности ФС2, ФС1 и цепи переноса электронов между ними:  $PI_{total} = PI_{ABS} * \delta_{Ro} / (1 - \delta_{Ro})$ ;

$q_E$  – Способность к рН-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции:  $q_E = (F_M - F_{6s}) / F_V$

$q_{PQ}$  – Способность пула хинонов тушить флуоресценцию:  $q_{PQ} = (F_M - F_I) / F_V$

Спектр поглощения света в пробах определяли на двухволновом спектрофотометре Hitachi 557 (Hitachi, Токио, Япония). Измерения спектров флуоресценции на водорослях проводились на спектрофлуориметре Fluorolog®-3 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Лонжюмо, Франция) с опцией TCSPC (time correlated single photon counting). Измерение флуоресценции проводили на длине волны 685 нм при возбуждении импульсным светодиодом LED (light emission diode) в диапазоне 390 – 700 нм.

Все измерения проводили не менее, чем в пяти повторностях. На рисунках представлены данные в виде средних значений не менее трех повторностей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *УФ-индуцированный мутагенез и отбор мутантных клонов*

Для получения любого типа мутаций был необходим подбор такой дозы мутагена, при которой отмечался бы высокий процент выхода мутантов с относительно высокой выживаемостью. Это, в свою очередь, требовало изучения летального и мутагенного действия различных доз используемого мутагена.

Изучение влияния УФ-света на выживаемость клеток дикого штамма *Chl. reinhardtii* СС-124 показало, что воздействие УФ-лучей оказывало на выживаемость клеток сильный угнетающий эффект. Количество выживших клеток после 1 мин облучения составило 31%. При этом выросшие колонии мало отличались от контрольной группы и имели средние размеры и зеленый цвет.

Облучение в течение 2 мин уменьшило количество выживших клеток до 10.5%. При этом наблюдалась неоднородность выросших колоний, как по размеру, так и по цвету (крупные, средние и очень мелкие, зеленого, светло-зеленого насыщенного зеленого цвета).

Количество выросших клеток после 3-минутного облучения составило 4 - 5%. Колонии микроводорослей были разного размера и, в основном, темно-зеленого цвета. После 5-минутного облучения выживших колоний микроводорослей не обнаруживалось. По низкой выживаемости клеток при более высоких дозах облучения можно было судить о сильном повреждающем действии УФ-света. Из полученных данных следует, что длительное воздействие УФ-светом с длиной волны 254 нм и интенсивностью 40 эрг/мм<sup>2</sup> оказывало летальное действие на клетки хламидомонады.

В ходе проведенных исследований было обнаружено, что облучение штамма *Chl. reinhardtii* СС-124 УФ-светом в течение 1-3 минут приводило к уменьшению выживаемости клеток и создавало условия для оптимального образования мутаций с явными фенотипическими проявлениями. Необходимо отметить, что выявление мутантов проводили не сразу после облучения, а после суточной темновой репарации клеток, так как в этом случае в результате ошибок в репликации ДНК повышалась частота возникновения различного рода мутаций.

В результате отбора образцов (без проверки генотипа) в различных условиях культивирования были получены субклоны, характеризующиеся изменением размера и цвета колонии. Полученные субклоны мы разделили на 6 групп. Контрольную группу составляли колонии зеленого цвета, средних размеров.

В фотоавтотрофных условиях культивирования:

Группа 1: субклоны зеленого цвета, крупных размеров (А) – 18%;

Группа 2: субклоны зеленого цвета, микроскопических размеров (В) – 32%;

Группа 3: субклоны светло-зеленого цвета, средних размеров (С) – 33%;

Группа 4: субклоны желтого цвета, средних размеров (D) – 17%.

В гетеротрофных условиях культивирования:

Группа 5: субклоны светло-зеленого цвета, средних размеров (Е) – 68%;

Группа 6: субклоны желтого цвета, средних размеров (F) – 32%.

Контрольную группу составляли колонии зеленого цвета, средних размеров.

Было установлено, что максимальная частота мутаций отмечалась после 2-минутного облучения УФ-светом (табл. 1).

Анализ выхода различных мутантных субклонов в фотоавтотрофных условиях культивирования показал, что наибольший процент составляли субклоны светло-зеленого цвета средних размеров (до 33%). В гетеротрофных условиях преобладали субклоны светло-зеленого цвета средних размеров – 68% от общего числа мутантных субклонов.

Таким образом, при воздействии УФ-излучения с длиной волны 254 нм и мощностью 40 эрг/мм<sup>2</sup> в течение 1-3 минут на 130 тыс. клеток штамма *Chl. reinhardtii* образовались 12056 выживших субклонов. Из этих колоний для проведения дальнейших исследований были отобраны 12 мутантных субклонов, которые подвергли дальнейшей селекции – до десяти последовательных циклов. Во всех опытах по селекции мутантных субклонов *Chl. reinhardtii* использовали питательную среду L2-min. Субклоны отбирали на основе их способности к восстановлению роста с сохранением полученных фенотипических признаков в течении серии пересевов. Далее из 12 колоний методом многократной селекции были отобраны 3 колонии из групп 3–5, сохранившие приобретенные в результате индуцированного мутагенеза признаки.

Полученный в фотоавтотрофных условиях клон был представлен пигментным мутантом светло-зеленого цвета, которого мы обозначили как СС-124у-1. Клоны, полученные в гетеротрофных условиях, также представляли собой пигментные мутанты, которые характеризовались желтой и светло-зеленой и были обозначены как СС-124у-2 и СС-124р-2, соответственно.

Все эти штаммы были близки по культурально-морфологическим характеристикам и незначительно отличались по размеру и цвету колоний. Клетки штаммов СС-124у-1 и СС-124р-2 имели размеры от 2 до 3,5 мкм и на твердой питательной среде образовывали колонии светло-зеленого цвета, тогда как клетки штамма СС-124у-2 были размером 3–3,5 мкм и образовывали на твердой среде желтые колонии. Все эти штаммы имели два жгутика одинаковой длины, расположенные на переднем конце клетки. Весь хлорофилл был сосредоточен в хроматофоре. Клетки хорошо росли при температуре воздуха 22-30°С на жидких и агаризованных питательных средах L2-min в фотоавтотрофных условиях.

#### *Исследование фотосинтетической активности пигментного мутанта СС-124у-1*

Штаммы СС-124у-2 и СС-124 были близки по спектральным и флуоресцентным параметрам. На рис. 1 приведены спектры поглощения света дикого и мутантного штамма *Chl. reinhardtii* СС-124у-1. Эти спектры были нормированы на красный максимум поглощения хлорофилла *a* при длине волны 680 нм. У мутантного штамма СС-124у-1, по сравнению с диким типом, наблюдалось значительное снижение поглощения света в области 650 нм, что указывало на снижение в несколько раз количества хлорофилла *b*, по сравнению с хлорофиллом *a*. Это также было

подтверждено данными, полученными при измерении спектров возбуждения флуоресценции (рис. 1Б).

На спектрах поглощения света у мутанта СС-124у-1 отмечалось уменьшение в области каротиноидов (470–480 нм) (рис. 1А). Эти изменения в области каротиноидов у мутантного штамма были еще сильнее выражены в спектрах возбуждения флуоресценции (рис. 1Б), что в свою очередь свидетельствовало о существенном снижении содержания каротиноидов у мутанта СС-124у-1.

Известно, что каротиноиды в водорослях не флуоресцируют, но эффективно переносят энергию возбуждения на хлорофилл *a*, который является основным источником флуоресценции. Более существенное уменьшение амплитуды флуоресценции при 480-500 нм в спектре возбуждения флуоресценции, по сравнению со спектрами поглощения, у мутанта СС-124у-1 указывало на ослабление связи каротиноидов с хлорофиллом *a*, который испускал флуоресценцию.

Флуоресцентные методы оценки активности фотосинтетического аппарата могут дать подробную информацию о начальных нарушениях клеточного метаболизма, в основном, на мембранном уровне [6, 7]. Кроме того, такие методы позволяют получить информацию о состоянии объекта в режиме реального времени. Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах водорослей, служит своего рода природным индикатором фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов флуоресценции. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтез свете ( $F_M$ ) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата ( $F_0$ ) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов ФС2, которая равна  $(F_M - F_0)/F_M = F_V/F_M$ . Параметр  $F_V/F_M$  представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия. Проведенные исследования *Chl. reinhardtii* показали, что максимальный квантовый выход первичной фотохимии  $F_V/F_M$  ( $\phi_{P_0}$ ) у дикого типа находится на высоком уровне (0.728) (табл.2). Напротив, у мутантного штамма СС-124у-1 параметр  $F_V/F_M$  снижен.

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей, начали использовать методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) при возбуждении интенсивным светом [5, 6]. Измерение индукционных кривых флуоресценции с высоким разрешением занимает всего несколько секунд и проводится на приборах типа РАМ или РЕА. На приборе М-РЕА-2 появилась возможность наряду с регистрацией флуоресценции измерять и изменения поглощения  $P_{700}$  (пигмент РЦ



ФС1). Таким образом, прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями ФС2 и ФС1 [5-7]. Более того, прибор регистрирует индукционные изменения замедленной флуоресценции.

Для более детальной оценки изменений фотосинтетической активности в клетках мутантов были измерены индукционные параметры быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния  $P_{700}$  на приборе М-РЕА-2.

На рис. 2А представлены кинетические кривые индукции флуоресценции после включения света, нормированные по уровню О. У контрольных клеток дикого типа кривая флуоресценции соответствовала кривой, описанной в литературе [5, 11]. В кинетике индукции флуоресценции в ответ на свет высокой интенсивности обычно наблюдается несколько стадий, известных как О-*J*-*I*-*P* переходы [5]. Начальный уровень О соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при «открытых» РЦ ФС2 ( $F_0$ ), когда все  $Q_A$  окислены. Фаза О-*J* обусловлена светоиндуцированным восстановлением  $Q_A$ , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного  $Q_A$ , обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления акцепторов  $Q_B$  и пула хинонов.

Полученные индукционные кривые флуоресценции у мутантного штамма СС-124у-1 отличаются от дикого типа (рис. 2А). У мутантного штамма наблюдалось снижение переменной флуоресценции  $F_V$  ( $F_V = F_M - F_0$ ), в основном, за счет  $F_M$ , что в свою очередь связывают с увеличением нефотохимического тушения [6].

Для проведения количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров кинетической кривой О-*J*-*I*-*P* использовали «*JIP*-тест» (табл. 2), параметры которого описаны в разделе «Материалы и методы».

Параметр  $ABS/RC$  у мутантных клеток СС-124у-1 был увеличен (2,865), что свидетельствовало о снижении у него доли активных РЦ ФС2 относительно дикого типа (1,485).

Доля  $Q_B$ -невосстанавливающих частиц ФС2 (параметр  $V_J$ ) у мутантного штамма была увеличена, а также был снижен показатель параметра  $\phi_{E_0}$ , который отражал максимальный квантовый выход переноса электронов –  $Q_A^-$  (табл. 2). Дикий тип СС-124 показал наиболее высокий квантовый выход, в то время как для мутанта была характерна низкая квантовая эффективность. Также наблюдалось снижение параметра  $V_I$  у мутанта СС-124у-1, который связывают с затруднением перехода электрона от ФС2 в пул «быстрых» пластохинонов (табл. 2) [6]. В свою очередь это в большей мере связано со снижением активности ФС2, в частности параметров  $F_V/F_M$  и  $V_J$  у мутанта.

Параметр  $PI_{ABS}$  является показателем функциональной активности ФС2,

отнесенный к поглощаемой энергии (ABS). Этот параметр имеет высокие показатели у клеток дикого типа, тогда как низкие показатели параметра  $PI_{ABS}$  у мутантного штамма указывают на низкую функциональную активность ФС2, в основном, из-за низкого максимального квантового выхода ФС2, вызванного, возможно, меньшим количеством активных РЦ и увеличением доли  $Q_B$ -невосстанавливающих центров.

Подобно  $PI_{ABS}$ , параметр  $PI_{total}$  (суммарный индекс производительности) учитывает не только функциональную активность ФС2, но и ФС1, а также активность цепи переноса электронов между ними. Таким образом,  $PI_{total}$  является очень чувствительным показателем и также может применяться для более широкой оценки производительности всего фотосинтетического аппарата.

Уменьшение эффективности передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на РЦ должно сопровождаться увеличением рассеивания неиспользуемой световой энергии. Действительно, квантовая эффективность рассеивания энергии ( $\phi_{D_0}$ ) у мутанта СС-124у-1 находилась на высоком уровне (табл. 2). Это коррелирует с увеличением у него  $\Delta pH$ -зависимого нефотохимического тушения  $q_E$ , которое рассчитывалось по спаду флуоресценции после достижения максимума ( $q_E = (F_M - F_{6s})/F_V$ ). Кроме того, хинонный пул мутанта СС-124у-1 обладал повышенной способностью тушить флуоресценцию на I-P фазе ( $q_{PQ}$ ).

Одновременное измерение кинетической кривой модулированного отражения при 820 нм показало, что у адаптированного к темноте объекта наблюдалось фотоиндуцированное окисление  $P_{700}$  РЦ ФС1 (с максимумом накопления  $P_{700}^+$  при  $t \approx 30$  мс), которое сменялось восстановлением  $P_{700}$  (рис. 2В). При этом сигналы флуоресценции, отражающие восстановление  $Q_A$ , и процессы восстановления  $P_{700}$  выходили на плато примерно синхронно. Параллельное накопление восстановленных форм  $P_{700}$  и  $Q_A$  отражает восстановление переносчиков на всем участке ЭТЦ между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФС1 в условиях, когда ферредоксин-НАДФ-редуктаза (ФНР) инактивирована инкубацией в темноте. При длительном освещении ( $t \approx 1-10$  с) наблюдали вторую волну окисления  $P_{700}$ , которую можно объяснить оттоком электронов от ФС1 при активации ФНР и ферментов цикла Кальвина.

Мутант СС-124у-1 сохранял способность  $P_{700}$  к окислению при включении света (рис. 2В). Однако, у него наблюдалось снижение скорости восстановления  $P_{700}$  от ФС2, из-за снижения эффективности последней. Это согласуется с данными анализа индукционных кривых быстрой флуоресценции.

Миллисекундная ЗФ возникает в результате вторичной реакции рекомбинации и

зависит от величины электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране, энергия которого снижает энергию активации реакции рекомбинации. Поэтому ЗФ является одним из методов, который позволяет следить за изменением градиента протонов мембраны клетки. Максимум на кривой ЗФ в миллисекундном диапазоне ( $I_1$ ) совпадает с фазой возрастания J-I на индукционной кривой быстрой флуоресценции (рис. 2А). Образование пиков  $I_1$  и  $I_2$  обусловлено накоплением определенных редокс-состояний (в разной степени соотношения субмиллисекундной  $Z^+PQ_A^-Q_B^-$  и миллисекундной  $Z^+Q_A^-Q_B^{2-}$  компонент), отвечающих за обратную рекомбинацию зарядов и испускание квантов ЗФ (т.е. высвечивающие состояния), а также усилением ЗФ за счет образующегося электрического потенциала на мембране ( $\Delta\psi$ ). Третий пик ЗФ  $I_3$  – в секундном диапазоне связывают с фотоиндуцированным образованием трансмембранного градиента протонов ( $\Delta pH$ ) [6], который тоже увеличивает константу скорости излучательных переходов (ЗФ) в РЦ ФС2. Эти закономерности рассмотрены во многих работах [5-7].

У мутантного штамма СС-124у-1 была значительно снижена интенсивность ЗФ на индукционной кривой на временах 10-50мс (пики ЗФ  $I_1$  и  $I_2$ ) и 1с (пик ЗФ  $I_3$ ) (рис. 2Б), что вероятно связано со значительным уменьшением нециклического транспорта и соответственно уменьшением энергизации фотосинтетических мембран.

Таким образом, одновременная регистрация индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также изменений  $P_{700}$  на М-РЕА-2 позволила проследить за отдельными реакциями накопления восстановленных переносчиков между фотосистемами, включением ФС1 и кинетикой электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране у мутантов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, УФ-лучи легко проникают в клетки, повреждая уникальные участки ДНК и, тем самым, вызывая различные мутационные изменения [12]. В связи с этим УФ-облучение используется при изучении индуцированного мутагенеза. В литературе встречаются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что УФ-лучи при воздействии на клетки могут блокировать синтез пигментов, а также замедляют рост клеток [12, 13]. Доказательством этого являются полученные нами мутантные субклоны, отличающиеся от контрольной группы по своей морфологии.

Известно, что содержание пигментов является интегральным показателем, который определяет не только развитие и активность фотосинтетической системы, но

и течение других ферментативных реакций, т.е. характеризует продуктивность, жизнеспособность и стойкость растительного организма [14]. Под воздействием УФ-лучей происходит нарушение функционирования пигментных систем растений, изменяется состав и количество пигментов. Показано, что в результате облучения в клетках растений подавляется синтез хлорофилла и происходит его фотодеструкция [14, 15]. Отмечается чувствительность синтеза хлорофилла *a* к мутагенам любой природы [16]. В то же время, воздействие УФ на хлорофилл *b* считается более слабым и при этом, одновременно, менее изученным. Действие УФ вызывает уменьшение величин в соотношениях хлорофилл *b*/хлорофилл *a* хлорофилл/каротиноиды [17].

Исследования, проведенные с помощью М-РЕА-2, позволили выявить особенности изменений реакции ФС2 и реакции окисления P<sub>700</sub>. Анализ индукционных кривых флуоресценции выявил уменьшение электронного транспорта в ФС2, в основном связанное со снижением доли активных РЦ, отношения Fv/Fm и увеличение доли Q<sub>B</sub>-невозстанавливающих центров, а также увеличением ΔрН-зависимого нефотохимического тушения. Кроме того, выявлено уменьшение процессов энергизации фотосинтетических мембран мутантных клеток.

В данной работе показано, что изменение индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции является одним из первых быстро регистрируемых параметров клеток микроводоросли после мутагенеза. Эти параметры могут быть весьма эффективно использованы для диагностики состояния исследуемых объектов. Полученные результаты имеют значение не только для понимания механизмов регуляции первичных процессов в ФС2 и ФС1, но и для использования различных параметров флуоресценции в биотестировании свойств воды в естественных и искусственных водоемах. Кроме того, выделенный пигментный мутант без хлорофилла *b* *Chl. reinhardtii* СС-124у-1 перспективен для оценки экологического состояния загрязненных водных экосистем. Применяемый генетический критерий – пигментный состав – является неоценимым преимуществом для использования данного мутанта в генетическом мониторинге окружающей среды с целью определения мутабельности исследуемой среды. Использование предлагаемого тест-объекта дает интегральную оценку состояния окружающей среды и повышает точность прогноза об отдаленных последствиях мутагенных загрязнений.

Авторы благодарят сотрудника кафедры биофизики МГУ Лукашева Е.П. за помощь в проведении спектральных исследований. Работа поддержана Казахстанским фондом фундаментальных исследований (проект № ГФ2015, № госрегистрации

015PK00290) и грантом Министерства образования и науки РК (No. 1582/ГФ4) Заядану Б.К.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заядан Б.К., Маторин Д.Н. Биомониторинг водных экосистем на основе микроводорослей. Москва: Альтекс, 2015. 252 с.
2. Сарapultzeва Е., Гераськин С., Цаценко Л.В. Биологический контроль окружающей среды. Генетический мониторинг. Москва: Академия, 2010. 208 с.
3. Zaydan B.K., Sadvakasova A.K., Saleh M.M., Gaballah M.M. Generation of pigment mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 and investigation of the mutants for evaluating the mutability of the waste water ecosystems // Intl. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2013. V. 2. P. 64–73.
4. Zaydan B.K., Sadvakasova A.K., Saleh M.M., Gaballah M.M. Generation and characterization of pigment mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 // African J. Biotechnol. 2014. V. 13. P. 274–279.
5. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1797. P. 1313–1326.
6. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллахвердиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. 220 с.
7. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. Москва-Ижевск: ИКИ-РХД, 2012. 256 с.
8. Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J. Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished  $\Delta pH$  and  $\Delta \psi$  components of the proton motive force // J. Bioenerg. Biomembr. 2013. V. 45. P. 37–45.
9. Ленбаум В.В., Булычев А.А., Маторин Д.Н. Влияние дальнего красного света на индукционные изменения быстрой и замедленной флуоресценции и редокс-состояния  $P_{700}$  у *Scenedesmus quadricauda* // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 229–238.
10. Маторин Д.Н., Тодоренко Д.А., Сейфуллина Н.Х., Заядан Б.К., Рубин А.Б. Влияние наночастиц серебра на параметры флуоресценции хлорофилла и реакции  $P_{700}$  зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Микробиология.

2014. Т. 83. С. 33–40.
11. *Lazar D., Schansker G.* Models of chlorophyll *a* fluorescence transients // *Photosynthesis in Silico* / Eds. Laisk A., Nedbal L., Govindjee. Dordrecht: Springer, 2009. P. 85–123.
  12. *Xue L., Zhang Y., Zhang T., An L., Wang X.* Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria // *Crit. Rev. Microbiol.* 2005. V. 31. P. 79–89.
  13. *Заядан Б.К., Пуртон С., Садвакасова А.К., Усербаева А.А., Болатхан К.* Выделение, мутагенез и оптимизация условий культивирования штаммов микроводорослей для производства биодизеля // *Физиология растений.* 2014. Т. 61. С. 135–142.
  14. *Rastogi R.P., Sinha R.P., Moh S.H., Lee T.K., Kottuparambil S., Kim Y.J., Rhee J.S., Choi E.M., Brown M.T., Häder D.P., Taejun H.* Ultraviolet radiation and cyanobacteria // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2014. V. 141. P. 154–169.
  15. *Moon Y., Kim S., Chung Y.* Sensing and responding to UV-A in cyanobacteria // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 16303–16332.
  16. *Han C., Liu Q., Yang Y.* Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings // *Plant Growth Reg.* 2009. V. 58. P. 153–162.
  17. *Воронова Е.Н., Конюхов И.В., Казимирко Ю.В., Погосян С.И., Рубин А.Б.* Изменения состояния фотосинтетического аппарата диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* при фотоадаптации и фотоповреждении // *Физиология растений* 2009. Т. 56. С. 836–843.

Таблица 1 Частота возникновения мутаций у клеток дикого типа СС-124 *Chlamydomonas reinhardtii* при различных дозах облучения

| Время облучения (мин) | Общее число колоний | Выживаемость клеток (%) | Число нормальных колоний | Число мутантных колоний | Обозначение отобранных колоний |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 0                     | 90 000              | 92-100                  | 86000                    | -                       | -                              |
| 1                     | 39060               | 31                      | 31248                    | 7812                    | А                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | В                              |
| 2                     | 13230               | 10.5                    | 8997                     | 4233                    | А                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | В                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | С                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | Д                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | Е                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | F                              |
| 3                     | 5670                | 4.5                     | 3629                     | 2041                    | Е                              |
|                       |                     |                         |                          |                         | F                              |
| 5                     | -                   | -                       | -                        | -                       | -                              |

Примечание:

|                                                        |                                       |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| А – субклоны зеленого цвета, крупных размеров          | } получены в фотоавтотрофных условиях |
| В – субклоны зеленого цвета, микроскопических размеров |                                       |
| С – субклоны светло-зеленого цвета, средних размеров   |                                       |
| Д – субклоны желтого цвета, средних размеров           |                                       |
| Е – субклоны светло-зеленого цвета, средних размеров   | } получены в гетеротрофных условиях   |
| F – субклоны желтого цвета, средних размеров           |                                       |



Таблица 2. Параметры ЛФ-теста кинетики индукционной кривой флуоресценции суспензии водорослей дикого типа СС-124 и мутантного штамма СС-124у-1 *Chlamydomonas reinhardtii*. Измерения кинетики индукции флуоресценции проводили на приборе М-РЕА-2 при освещении действующим светом с интенсивностью 1300  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{c}$ .

|                                       | СС-124      | СС-124у-1   | Описание параметра                                                                                                         |
|---------------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Phi_{\text{Po}}$ ,<br>( $F_v/F_M$ ) | 0.728±0.017 | 0.365±0.002 | Максимальный квантовый выход первичной фотохимии, после темновой адаптации.                                                |
| $\Phi_{\text{Eo}}$                    | 0.353±0.004 | 0.219±0.001 | Квантовая эффективность переноса электронов далее $Q_A^-$                                                                  |
| $\Phi_{\text{Do}}$                    | 0.272±0.005 | 0.635±0.01  | Эффективность рассеивания энергии антенным комплексом ( $t=0$ ).                                                           |
| ABS/RC                                | 1.485±0.014 | 2.865±0.046 | Показатель эффективности, выражаемый как концентрация реакционных центров в общем пуле хлорофиллов.                        |
| $PI_{\text{ABS}}$                     | 1.695±0.023 | 0.302±0.004 | Индекс производительности – показатель функциональной активности ФС2, отнесенный к поглощаемой энергии.                    |
| $PI_{\text{total}}$                   | 1.505±0.01  | 0.666±0.005 | Суммарный индекс производительности - показатель функциональной активности ФС2, ФС1 и цепи переноса электронов между ними. |
| $q_E$                                 | 0.177±0.004 | 0.343±0.005 | Способность к рН-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции.                                                  |
| $q_{\text{PQ}}$                       | 0.228±0.002 | 0.413±0.003 | Способность пула хинонов тушить флуоресценцию.                                                                             |

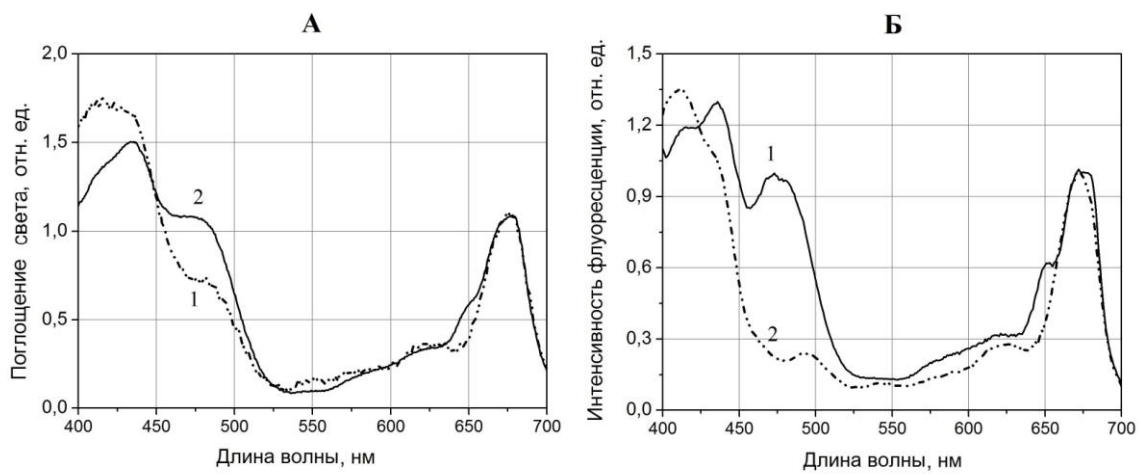


Рис. 1. Садвакасова с соавт.

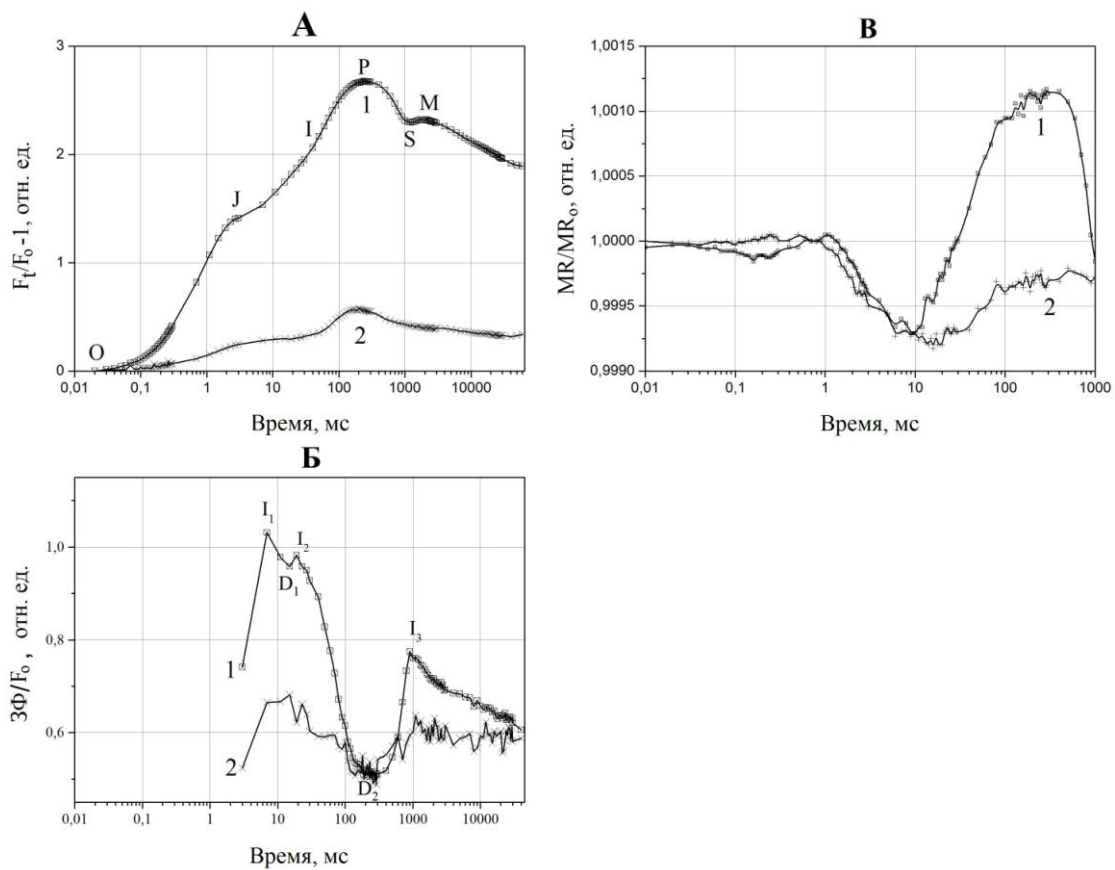


Рис. 2. Садвакасова с соавт.

## ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис.1. Спектры поглощения (А) и возбуждения флуоресценции (Б) клеток дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 (1) и мутантного штамма СС-124у-1 (2) (спектры нормированы на красный максимум хлорофилла *a* при 680 нм).

Рис.2. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (А), замедленной флуоресценции (Б) и изменения поглощения при длине волны 820 нм (В) клеток дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* (СС-124) (1) и мутантного штамма СС-124у-1 (2). Замедленная флуоресценция (ЗФ/ $F_0$ ) нормирована на  $F_0$ . Интенсивность действующего красного света 1300 мкЕ/(м<sup>2</sup> с). Одновременные измерения всех параметров выполнены на приборе М-РЕА-2.