

УДК 581.1

© 1992 г. В.Е. СЕМЕНЕНКО, Л.А. ШИТОВА, Т.С. РУДОВА,  
Н.А. ПРОНИНА

**РЕГУЛЯТОРНЫЕ 2-ДЕЗОКСИ-Д-ГЛЮКОЗА-РЕЗИСТЕНТНЫЕ  
МУТАНТЫ *CHLORELLA* С НАРУШЕННОЙ СИСТЕМОЙ НЕГАТИВНОЙ  
МЕТАБОЛИТНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМА ХЛОРОПЛАСТА  
КОНЕЧНЫМИ ПРОДУКТАМИ ФОТОСИНТЕЗА**

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук, Москва*

Описан метод получения и отбора спонтанных и УФ-индуцированных регуляторных мутантов клеток *Chlorella*, несущих дефект в системе негативной метаболической регуляции экспрессии генома хлоропласта, где глюкоза как конечный продукт фотосинтетического восстановления углерода выполняет функцию отрицательного эффектора. Метод включает в себя два этапа: 1) отбор 2-дезоксид-Д-глюкоза резистентных (2дДГ<sup>Res</sup>) мутантов, устойчивых к репрессирующему действию стереохимического аналога глюкозы; 2) отбор из 2дДГ<sup>Res</sup>-мутантов форм, устойчивость которых обусловлена нарушением транспорта экзогенной глюкозы в клетку (2дДГ<sup>Res</sup>CRS-мутанты) и форм, у которых транспорт глюкозы не нарушен и устойчивость обусловлена дефектом в механизмах регуляторного действия глюкозы в хлоропласте (2дДГ<sup>Res</sup>CRS-мутанты). Изучены свойства CRS-мутантов. Показано, что в отличие от исходного штамма *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 у полученных CRS-мутантов аналог глюкозы (2дДГ) не подавляет рост культуры, фотосинтетическое выделение кислорода, биосинтез хлорофилла и синтез мембранно-связанной хлоропластной карбоангидразы. Показано, что CRS-мутанты отличаются свойствами суперпродукторов ассимилятов и накапливают при блокировании деления клеток на 30—40% больше углеводов, чем исходная форма. Делается вывод, что у CRS-мутантов нарушен внутрихлоропластный «feed-back»-механизм (глюкозный эффект) метаболической регуляции генов фотосинтеза, который в норме (у исходной культуры) ограничивает сверхсинтез структурных белков, ферментов и ассимилятов в хлоропласте.

*Геном хлоропласта — метаболическая регуляция — глюкоза — Chlorella — регуляторные мутанты — суперпродукция ассимилятов.*

Ранее в нашей лаборатории с помощью стереохимических слабометаболизируемых аналогов глюкозы (2-дезоксид-Д-глюкоза, 3-О-метилглюкоза) было показано, что в хлоропласте функционирует молекулярный механизм негативной метаболической регуляции фотосинтеза на генетическом уровне, в котором глюкоза, как конечный продукт фотосинтетического восстановления углерода, играет роль отрицательного эффектора [1, 2]. При этом, как видно из табл. 1, 2-дезоксид-Д-глюкоза (2дДГ) вызывает комплексное обратимое подавление (репрессию-дерепрессию) многих ключевых хлоропластных генов, контролирующих синтез белков реакционных центров фотохимических систем и переносчиков электронов в ЭТЦ хлоропласта, ферментов цикла Кальвина, рибосомных и информационных РНК. Глюкозный эффект регуляции матричной активности генома хлоропласта является, по-видимому, типичным примером биологической регуляторной системы с глубокой отрицательной обратной связью («feed-back»-механизм), которая ограничивает сверхсинтез структурных белков, ферментов и ассимилятов в хлоропласте и выполняет функцию конечного исполнительного механизма донорно-акцепторных связей фотосинтетического аппарата с субстратопотребляющими процессами в клетке.

Было высказано предположение, что регуляторное действие глюкозы в хлоропласте основано на ее обратимом взаимодействии с регуляторными макромолекулами

Действие 2-дезоксид-Д-глюкозы (2дДГ) на синтез компонентов хлоропласта, его структурную организацию и функциональную активность

Параметры	Объект	Действие 2дДГ, % от исходного значения		Ссылка
		+ 2дДГ	-2дДГ	
Белок фракции I	<i>Chlorella</i>	29,0	111,8	[1, 3]
РБФ-карбоксилаза	»	26,3	97,6	[4, 5]
Большая субъединица РБФК	»	60,0	120,0	»
Малая субъединица РБФК	»	100,0	100,0	»
Фосфорibuлокиназа	»	0,0	130,0	[2, 4]
Рибозо-2-фосфатизомераза	»	50,0	94,3	»
Карбоангидраза хлоропласта	»	0,0	104,6	[1, 2]
Белок 32 кД (Д2-белок)	<i>Scenedesmus</i>	0,0	100,0	[6]
Активность РЦ ФС I	<i>Chlorella</i>	3,0	100,0	[2, 7]
Активность РЦ ФС II	»	0,0	100,0	»
П700	»	0,0	100,0	»
Хлорофилл	»	2,0	100,0	[8]
Агрегированные формы хлорофилла (686, 692, 697, 703 нм)	»	нет	есть	[1, 9]
Цитохром f	»	5,0	100,0	[10]
Пиреноид	»	нет	есть	[2, 11]
Стыковка тилакоидов	»	нет	есть	[11, 12]
Выделение O <sub>2</sub>	»	0,0	100,0	[1, 2]
pРНК 70S рибосом (1,1)	»	32,5	100,0	[7]
pРНК 70S рибосом (0,56)	»	28,2	100,0	»
mРНК <i>psbD</i> гена	<i>Synechocystis</i>		репрессия	[13]
mРНК <i>desA</i> гена	»		индукция	»

Rx (рис. 1), которые контролируют светозависимую активность генов хлДНК, ответственных за синтез репрессоров R в хлоропласте [4, 14].

Для выяснения молекулярной организации и физико-химических свойств участвующих в этом процессе элементов существенным является привлечение генетических методов и подходов и, прежде всего, получение и изучение свойств регуляторных мутантов, несущих дефекты в системе негативной метаболической регуляции генома хлоропласта. В данной статье описаны разработанные нами [15, 16] методы получения таких мутантов и некоторые их свойства.

#### МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали зеленую одноклеточную водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer. var. *vulgaris* IPPAS C-1 (штамм Косикова, известен как *Chlorella sp.* K) из коллекции культур одноклеточных водорослей Института физиологии растений РАН — IPPAS [17].

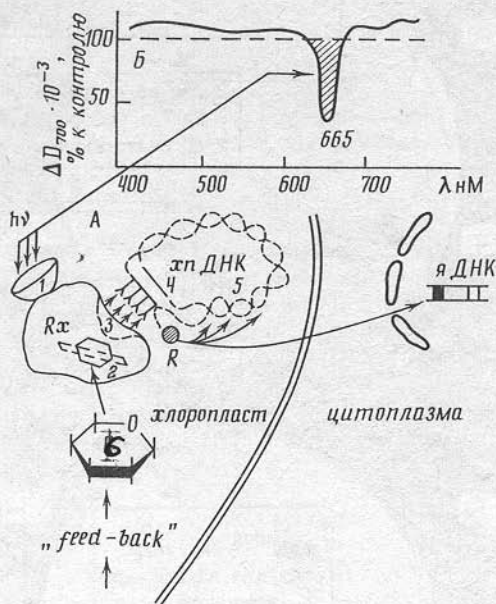
Водоросли выращивали в интенсивной культуре в накопительном режиме [18], а также на агаризованной минеральной среде на чашках Петри в автотрофных условиях с использованием среды Тамия. Культивирование проводили в стерильных условиях при круглосуточном освещении люминесцентными лампами типа ЛБ-80 (освещенность 11 Вт · м<sup>-2</sup>), температуре 36° и непрерывном барботировании газовой смеси с 1,7% CO<sub>2</sub>.

Культуры выращивали до плотности 70—100 млн. клеток · мл<sup>-1</sup>, после чего вносили 2дДГ («Sigma», США) в конечной концентрации 0,25%. Стерилизацию 2дДГ осуществляли фильтрацией через мембранный фильтр. Эффект действия аналога глюкозы на исходную культуру и полученные мутанты оценивали по изменению скорости

Рис. 1. Схема возможных молекулярных взаимодействий в процессе светозависимой метаболической регуляции экспрессии генома хлоропласта глюкозой

А — схема молекулярных взаимодействий.  $Rx$  — регуляторная конформационно подвижная макромолекула белковой природы; 1 — сайт связывания фоторецептора, 2 — сайт связывания молекул глюкозы (аллостерический центр), 3 — сайт связывания с регуляторными элементами гена, кодирующего репрессор в хлДНК, 4 — регуляторные последовательности гена репрессора, 5 — структурные гены хлДНК, 6 — молекула глюкозы,  $R$  — репрессор.

Б — спектр действия глюкозного эффекта репрессии хлДНК. В темноте  $R$  находится в конформационном состоянии, когда сайт 3 не активен, ген репрессора (4) конститутивно экспрессируется и молекулы репрессора ( $R$ ) подавляют структурные гены фотосинтеза (5). При освещении в результате фотоконформационного перехода  $Rx$  активируется 3, подавляя синтез репрессоров ( $R$ ), что приводит к экспрессии генов фотосинтеза (5). Связывание молекулы глюкозы с аллостерическим центром 2 приводит к обратному переходу конформации  $Rx$ , активный центр 3 инактивируется, что приводит к возобновлению синтеза репрессоров и соответственно подавлению генов фотосинтеза!



роста культур, содержания хлорофилла и интенсивности фотосинтетического выделения кислорода.

Содержание хлорофилла определяли на спектрофотометре СФ-14 по изменению спектров поглощения суспензии водорослей.

Продуктивность культуры оценивали по накоплению сухой биомассы, а также по изменению поглощения суспензии при 750 нм на предварительно проградуированном фотокалориметре Specol («Carl Zeiss», ФРГ).

Интенсивность фотосинтеза определяли по выделению  $O_2$  амперометрическим методом с помощью электрода Кларка.

Скорость роста культуры учитывали прямым подсчетом числа клеток под микроскопом в камере Горяева и по изменению оптической плотности суспензии [18].

Распределение клеток по размерам у исходной культуры и полученных мутантов определяли на счетчике Coulter Counter ZM («Coultronics France», Франция).

Содержание углеводов определяли методом Дюбуа с соавт. [19] в модификации.

Активность мембранно-связанной хлоропластной формы карбоангидразы, как маркерного белка, кодируемого в хлДНК, определяли потенциометрическим методом [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Получение и отбор мутантов.** Исходя из высказанной гипотезы о механизмах регуляторного действия глюкозы в хлоропласте (рис. 1), регуляторные мутанты с дефектом в «feed-back»-механизме регуляции хлДНК должны отличаться следующими маркерными признаками: 1) способностью к росту на средах с аналогами глюкозы; 2) способностью к активному транспорту в клетки экзогенной глюкозы и ее аналогов; 3) способностью к гетеротрофному росту на глюкозе в темноте, что свойственно исходному штамму *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1; 4) устойчивостью фотосинтетического выделения кислорода, синтеза пигментов и хлоропластных белков к репрессирующему действию аналогов глюкозы; 5) способностью накапливать сверхвысокие количества ассимилятов в хлоропласте.

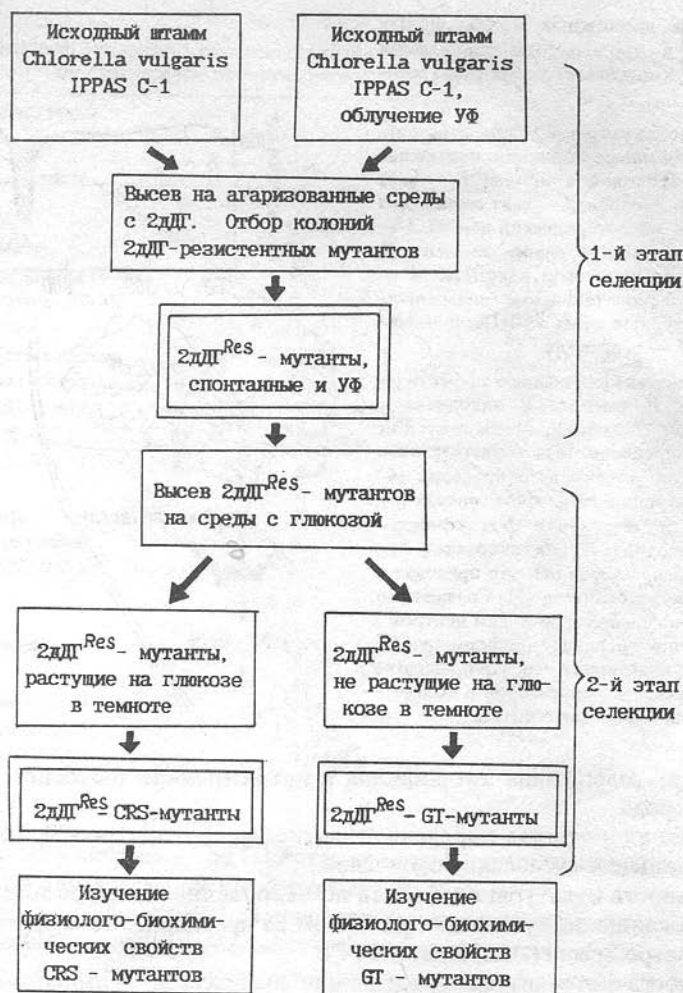


Рис. 2. Схема 2-этапной селекции 2дДГ-резистентных регуляторных мутантов с нарушенной системой негативной метаболической регуляции экспрессии генома хлоропласта (CRS-мутанты) и с нарушенной системой транспорта глюкозы в клетку (GT-мутанты)

Исходя из этих предсказаний, нами был разработан способ [15] двухэтапного отбора регуляторных 2дДГ-резистентных мутантов, несущих дефект в системе метаболической регуляции экспрессии генома хлоропласта, в которой глюкоза выполняет роль отрицательного эффектора, — CRS-мутантов (chloroplast regulatory systems mutants). Схема такого отбора представлена на рис. 2.

На первом этапе селекции осуществляли отбор 2дДГ-резистентных мутантов. Для получения спонтанных и УФ-индуцированных 2дДГ-резистентных мутантов культуры высевали на чашки Петри на селективирующие агаризованные минеральные среды, содержащие 2дДГ в концентрации, которая полностью подавляла фотосинтез и рост исходной культуры *Chlorella*. Для высева на чашки использовали культуру в линейной стадии роста.

Для получения спонтанных мутантов на чашки высевали культуру без предварительной обработки мутагенами. Для получения УФ-индуцируемых мутантов культуру предварительно облучали УФ в чашке Петри в тонком слое в течение 1—5 мин с помощью бактерицидной лампы БУФ-15, которая размещалась над чашками на расстоянии 30 см от поверхности суспензии водорослей.

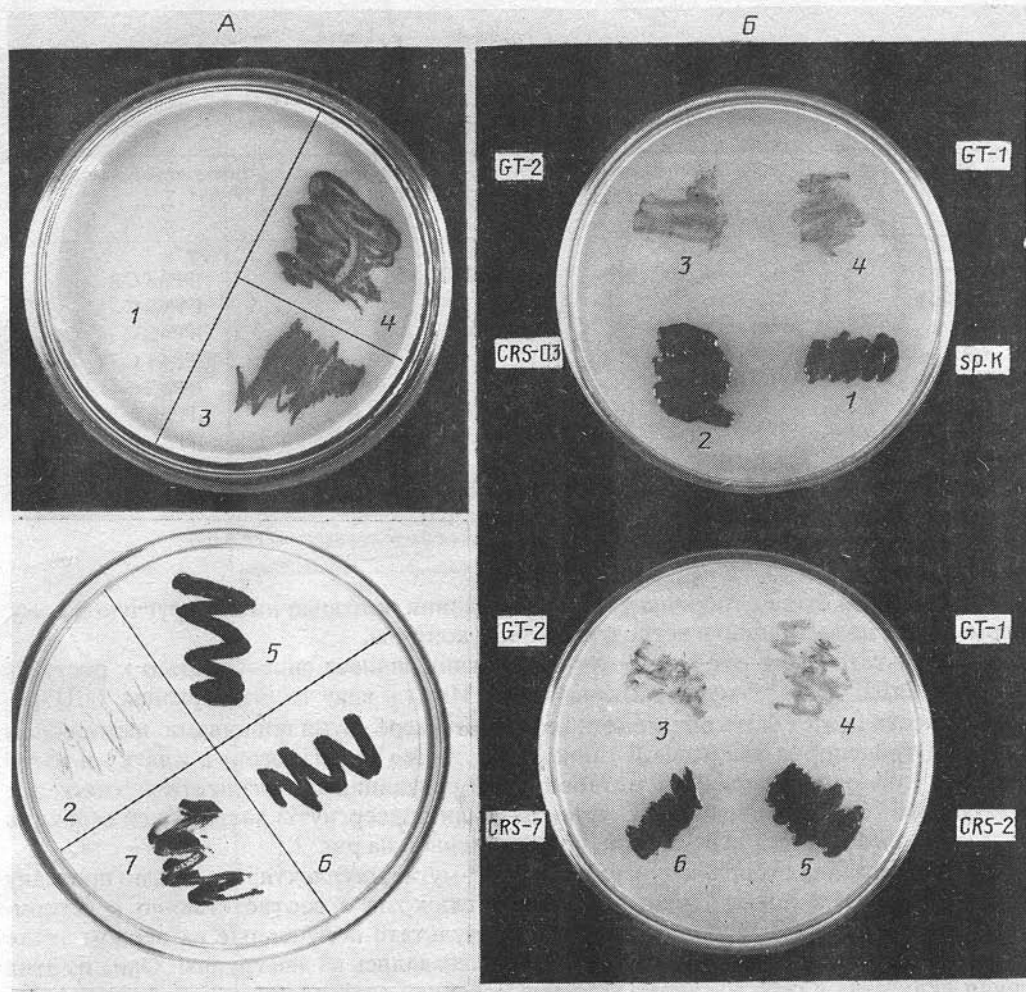


Рис. 3. Рост исходного штамма *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 и 2дДГ-резистентных мутантов на агаризованных средах

А — рост на минеральной среде с 2-деокси-Д-глюкозой на свету (1-й этап селекции); 1, 2 — исходный штамм; 3—7 — мутанты: 3 — CRS-7, 4 — CRS-8, 5 — CRS-03, 6 — CRS-2, 7 — GT-1.

Б — рост на глюкозе в темноте (2-й этап селекции); 1 — исходный штамм; 2—6 — мутанты: 2 — CRS-03, 3 — GT-2, 4 — GT-1, 5 — CRS-2, 6 — CRS-7

Плотность культуры, высеваемой на чашки с селективной питательной средой и на контрольной чашке (среда без 2дДГ), была равна  $2 \times 10^6$  клеток в 1 мл. Нанесенная на агар суспензия клеток равномерно распределялась шпателем по поверхности агара и чашки помещались в условия круглосуточного освещения при температуре  $25-27^\circ$ . В контрольном варианте на 3-и сут начинался интенсивный рост культуры, тогда как в опытных вариантах к этому времени не наблюдался рост культур. Однако, через 10—14 сут на чашках с 2дДГ появились отдельные мелкие колонии. При этом частота появления спонтанных мутантов была равна  $2 \times 10^{-5}$  и  $5 \times 10^{-5}$ , а УФ-индуцируемых —  $7 \times 10^{-3}$ , и зависела от концентрации аналога глюкозы. Следует отметить при этом, что среди УФ-индуцированных мутантов встречались серповидные, крапчатые, пигментные колонии, которые характерны для УФ-мутантов хлореллы, и для даль-

Сравнительная характеристика исходного штамма (WT) и 2-дезоксид-Д-глюкоза резистентных мутантов *Chlorella vulgaris*

Штаммы	Автотрофный рост		Гетеротрофный рост на глюкозе в темноте	Номер штамма в коллекции IPPAS*
	-2дДГ	+2дДГ		
WT	+	-	+	IPPAS C-1
CRS 03	+	+	+	IPPAS C-75
CRS 2	+	+	+	IPPAS C-78
CRS 3	+	+	+	IPPAS C-79
CRS 7	+	+	+	IPPAS C-81
CRS 8	+	+	+	IPPAS C-82
CRS 10	+	+	+	IPPAS C-83
GT 1	+	+	-	IPPAS C-76
GT 2	+	+	-	IPPAS C-77

\*IPPAS — Коллекция культур одноклеточных водорослей Института физиологии растений РАН [17].

нейшей работы были отобраны только те колонии, которые имели круглую форму, нормальную пигментацию и четко очерченные контуры.

В результате были отобраны мутанты, отличавшиеся способностью к росту на средах с 2дДГ (2дДГ<sup>Res</sup>-мутанты) (рис. 3, А). Имея в виду то, что признак 2дДГ-резистентности может быть обусловлен по крайней мере двумя причинами: нарушением системы транспорта экзогенной глюкозы (а также ее аналогов) в клетку и нарушением глюкозного эффекта метаболитной регуляции фотосинтетических генов в хлоропласте, отобранные 2дДГ-мутанты были подвергнуты дальнейшей селекции (2-й этап) в соответствии со схемой, представленной на рис. 2.

На втором этапе отбора полученные 2дДГ<sup>Res</sup>-мутанты селектировались по признаку их способности к поглощению экзогенной глюкозы и соответственно к гетеротрофному росту на глюкозе в темноте. В результате полученные на первом этапе 2дДГ-резистентные мутанты действительно распадались на две группы. Одна из этих групп включала в себя мутанты, которые потеряли свойственную исходному штамму *Chlorella* IPPAS C-1 способность к гетеротрофному росту на глюкозе в темноте, а другая сохранила эту способность, хотя также отличалась 2дДГ-резистентностью (рис. 3, Б).

Первая из этих групп была отнесена к мутантам с нарушенной системой транспорта глюкозы в клетку — GT-мутанты (glucose translocation mutants), а вторая к мутантам с нарушением глюкозного механизма метаболитной регуляции экспрессии генома хлоропласта — CRS-мутанты (chloroplast regulatory systems mutants).

Отобранные таким образом спонтанные и УФ-индуцированные 2дДГ-резистентные мутанты хлореллы (табл. 2) хорошо сохраняют признак устойчивости к репрессирующему действию аналогов глюкозы даже в отсутствие селектирующего фактора (2дДГ) и поддерживаются в условиях периодического пересева в коллекции IPPAS с 1983 г. в течение 9 лет [17].

**Изучение ростовых характеристик 2дДГ<sup>Res</sup>-мутантов.** Изучение ростовых характеристик и продуктивности CRS- и GT-мутантов показало, что они не отличаются по скорости роста и накоплению биомассы от исходной формы в начальный период накопительного роста культур (рис. 4). Вместе с тем при увеличении плотности (больше 500 млн клеток в 1 мл) наблюдаются некоторые различия в скорости роста исходной формы и полученных мутантов, одни из которых выходят на плато при меньшей, а другие при большей плотности по сравнению с исходным штаммом. Последнее может быть обусловлено различиями в содержании хлорофилла и оптических свойствах суспензии полученных мутантов.

Отличительной особенностью полученных мутантов является то, что размер кле-

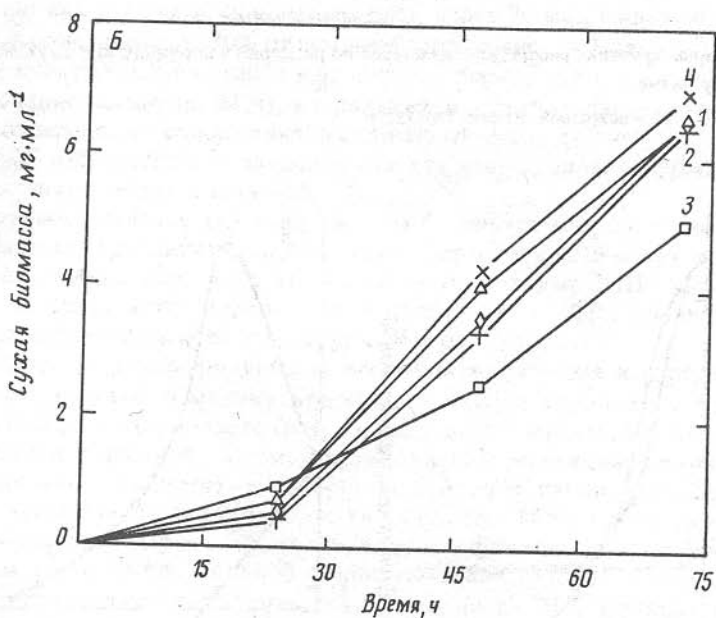
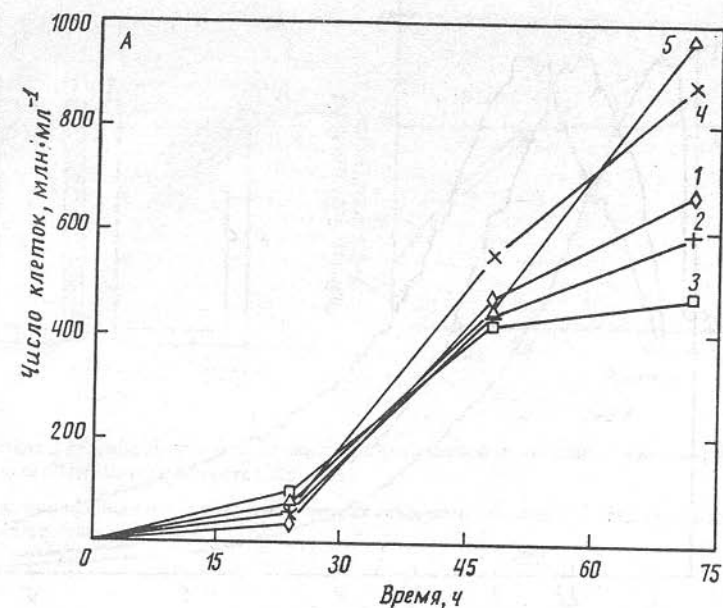


Рис. 4. Характеристика роста (А) и продуктивности (Б) исходного штамма и 2дДГ<sup>Res</sup>-мутантов *Chlorella*

1 — исходный штамм; 2 — CRS-03, 3 — CRS-4, 4 — CRS-UV1, 5 — CRS-10

ток, как GT-, так и CRS-мутантов, существенно меньше по сравнению с исходным штаммом, что видно из кривых распределения клеток по размерам в популяциях культур (рис. 5).

**Изучение действия 2-дезоксид-Д-глюкозы на CRS-мутанты.** Как видно из рис. 6, А, фотосинтетическое выделение кислорода у исходной формы *Chlorella* полностью подавляется через 60—75 мин после внесения 2дДГ в суспензию. В то же время у CRS-мутанта выделение кислорода хотя и подавляется в начальный период с такой

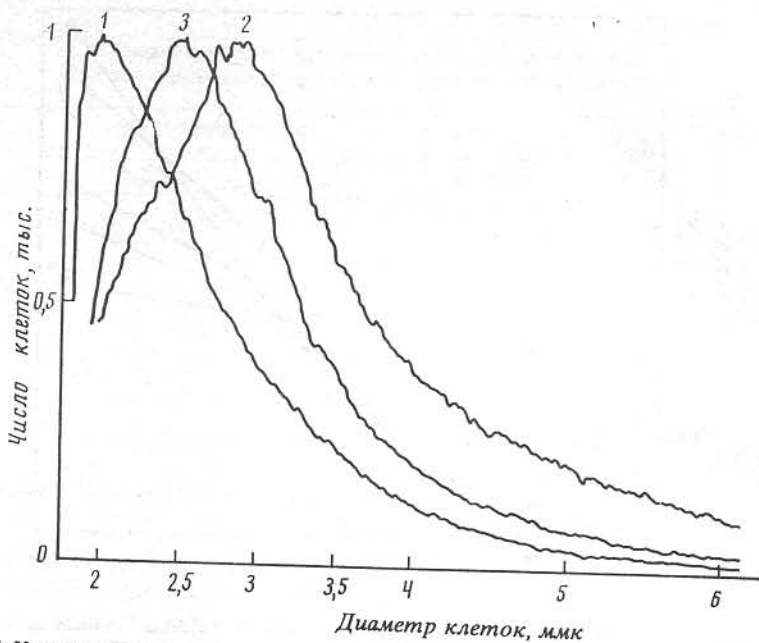


Рис. 5. Характеристика распределения клеток по размерам у исходного штамма *Chlorella* и 2дДГ<sup>Res</sup>-мутантов

1 — CRS-03, 2 — исходный штамм, 3 — GT-1

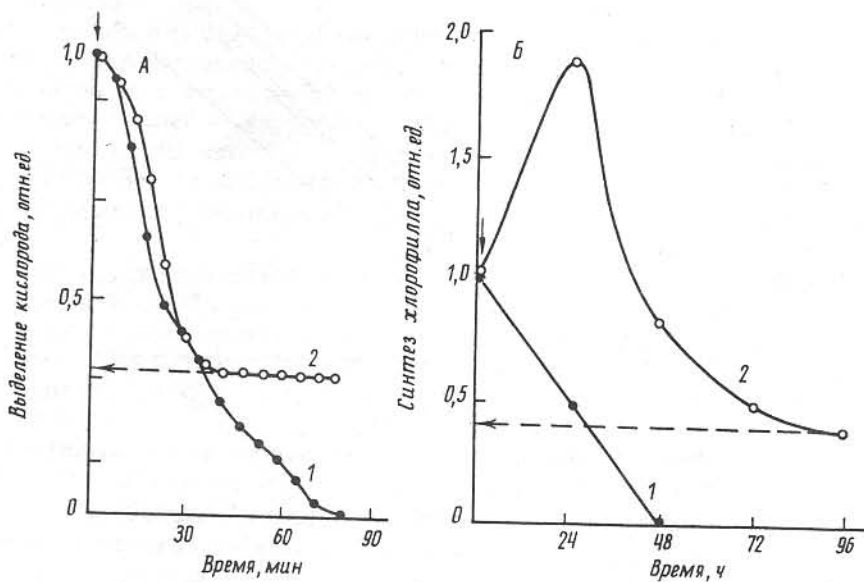


Рис. 6. Действие 2-дезоксид-Д-глюкозы на фотосинтетическое выделение кислорода (А) и синтез хлорофилла (Б) у исходного штамма *Chlorella* (1) и мутанта CRS-03 (2)

Стрелка — момент внесения 2дДГ

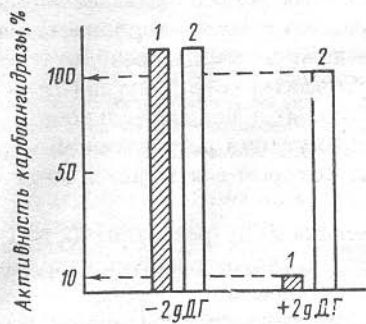


Рис. 7

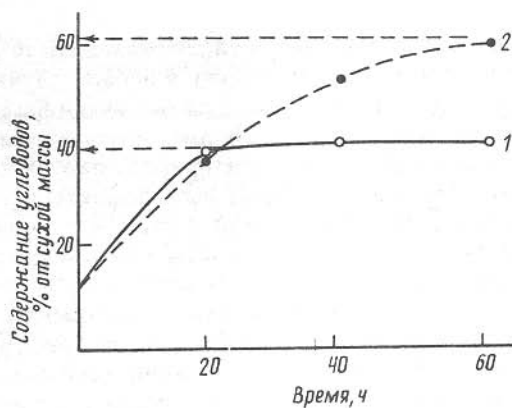


Рис. 8

Рис. 7. Действие 2-дезоксид-Д-глюкозы на синтез хлоропластной мембранно-связанной карбоангидразы у исходного штамма *Chlorella* (1) и мутанта CRS-03 (2)

Рис. 8. Динамика накопления углеводов в клетках исходного штамма *Chlorella* (1) и мутанта CRS-03 (2) в условиях азотного голодания

же скоростью как и у дикой формы, однако через 30 мин выделение  $O_2$  стабилизируется на уровне примерно 30% от исходной интенсивности. Накопление хлорофилла (рис. 6, Б) в культуре CRS-мутанта в начальный период после внесения 2дДГ сохраняется (в течение примерно 24 ч), а в дальнейшем стабилизируется на уровне примерно 30% от исходного содержания, в отличие от дикой формы, где сразу же после внесения 2дДГ наблюдается подавление синтеза хлорофилла, содержание которого к 48-ми ч достигает нулевых значений.

Сравнительное изучение действия 2дДГ на биосинтез хлоропластной мембранно-связанной формы карбоангидразы у исходной формы и у CRS-мутантов обнаружило контрастные различия. Как видно из рис. 7, у дикого штамма 2дДГ вызывает полное подавление биосинтеза этого фермента, в то время как у CRS-мутанта содержание карбоангидразы практически не изменилось (96% от контроля).

**CRS-мутанты — суперпродуценты ассимилятов.** Исходя из предсказаний, вытекающих из гипотезы о молекулярной организации механизмов регуляторного действия глюкозы в хлоропласте (рис. 1), следовало ожидать, как отмечалось, что CRS-мутанты с нарушенной системой метаболитной регуляции генома хлоропласта должны отличаться свойствами суперпродуцентов и накапливать сверхвысокие количества ассимилятов (крахмала) в хлоропласте. Модельные эксперименты с разобщением клеточных функций деления клеток и фотосинтеза, которое достигалось исключением азота из питательной среды, показали (рис. 8), что в клетках CRS-мутантов действительно накапливается примерно на 30% больше углеводов по сравнению с исходной культурой.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое нарушение в механизмах метаболитной регуляции экспрессии генома хлоропласта, которые определяют устойчивость полученных 2дДГ-резистентных CRS-мутантов к репрессирующему действию глюкозы, могут быть обусловлены различными причинами. Это может быть связано с мутациями генов, ответственных за синтез ферментов углеводного метаболизма и нарушением процесса образования эффекторов в хлоропласте — молекул глюкозы, т.е. нарушением процессов появления регуляторного сигнала. Или мутациями генов, контролирующими синтез регуляторных макромолекул и мессенджеров, с которыми взаимодействует глюкоза,

как эффектор, т.е. нарушением механизмов детекции сигнала. Вероятнее всего, имеет место второе, поскольку в первом случае система детекции оказалась бы не нарушенной и аналоги глюкозы вызывали бы репрессию генома хлоропласта у этих мутантов, как и у дикой формы, что, как видно из полученных результатов, не наблюдается. В чем состоит природа нарушения регуляторного действия глюкозы остается неясным. Это могут быть дефекты регуляторных последовательностей гена репрессора, или структурной части этого гена, или мутации регуляторной макромолекулы Rx (рис. 1), с аллостерическим центром которой связывается молекула глюкозы.

Интересной является высокая стабильность признака 2дДГ-резистентности CRS-мутантов, что указывает на селективные преимущества клеток с нарушенным механизмом метаболической регуляции экспрессии генома хлоропласта.

Не менее интересна кинетика подавления фотосинтетического выделения кислорода и биосинтеза хлорофилла (рис. 6) у мутанта CRS-03 при действии 2дДГ, которая описывается двухфазной кривой с выходом на стационарное значение, уровень которого, как показали исследования, различен у разных CRS-мутантов. Это может быть связано с множественностью копий ДНК в геноме хлоропласта, не все из которых затрагиваются мутациями. Сохраняющиеся уровни фотосинтеза и биосинтеза хлорофилла могут определяться экспрессией копий ДНК, несущих мутации, а степень подавления — репрессией под влиянием 2дДГ молекул хлДНК, не затронутых мутациями.

Дальнейшее изучение полученных мутантов открывает возможность для выяснения этих вопросов молекулярно-генетическими методами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов В.Е. Механизмы эндогенной регуляции фотосинтеза и адаптивные свойства хлоропласта // Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982. С. 164.
2. Semenenko V.E., Zvereva M.G., Kupitsova E.S. et al. Metabolite regulation of the chloroplast genome expression and the chloroplast-cytoplasm regulatory relationships // Compartments in algal cells and their interaction. Berlin: Springer-Verlag, 1984. P. 128.
3. Семенов В.Е., Касаткина Т.И., Рудова Т.С. Обратимое подавление синтеза белка фракции I под влиянием 2-дезоксид-глюкозы // Физиология растений. 1976. Т. 23. Вып. 6. С. 1225.
4. Семенов В.Е. Генетический контроль и клеточные механизмы регуляции фотосинтеза // Фотосинтез и продукционный процесс. М.: Наука, 1988. С. 69.
5. Касаткина Т.И., Веденев А.Н., Семенов В.Е. Синтез рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы и ее субъединиц при адаптивных перестройках клеток *Chlorella sp.* К. // Физиология растений. 1989. Т. 36. Вып. 6. С. 1080.
6. Setlik I., Setlikova E., Masojidek J. et al. The effect of translation and transscrition inhibitors on the development of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus* // Photosynthesis Y. Chloroplast development. Philadelphia: Balaban International Science Services, 1981. P. 807.
7. Зверева М.Г., Климова Л.А., Семенов В.Е. Репрессия синтеза РНК и нарушение активности фотохимических систем хлоропласта при действии 2-дезоксид-глюкозы и гипертрофированном накоплении ассимилятов в клетках хлореллы // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 6. С. 1218.
8. Семенов В.Е., Афанасьева В.П. К изучению механизмов авторегуляции фотосинтеза. Обратимый 2-дезоксид-глюкозный эффект репрессии фотосинтетического аппарата клетки // Физиология растений. 1972. Т. 19. Вып. 5. С. 1074.
9. Зверева М.Г., Шубин Л.М., Климова Л.А., Семенов В.Е. Обратимое изменение спектров низкотемпературной флуоресценции интактных клеток *Chlorella*, вызываемое репрессией фотосинтетического аппарата 2-дезоксид-глюкозой // Докл. АН СССР. 1979. Т. 244. Вып. 5. С. 1244.
10. Климова Л.А., Рощина В.В., Зверева М.Г., Семенов В.Е. Обратимое нарушение электрон-транспортной цепи фотосинтеза интактных клеток хлореллы при действии стереохимического аналога глюкозы // XI Всесоюз. рабоче совещ. по вопросам круговорота веществ в замкнутых системах на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев: Наукова думка, 1983. С. 50.
11. Владимирова М.Г. Изменение ультраструктурной организации при функциональных перестройках клетки *Chlorella sp.* К. // Физиология растений. 1976. Т. 23. Вып. 6. С. 1180.
12. Semenenko V.E. Metabolite regulation of chloroplast genome expression and of the activity of the photosynthetic apparatus // Photosynthesis Y. Chloroplast development. Philadelphia: Balaban International Science Services, 1981. P. 767.
13. Lebedeva N.B., Semenenko V.E. The effect of stereochemical glucose analogue on the mRNA levels of psbD and desA genes in *Synechocystis* PCC 6803 // Russian-USA workshop on photosynthesis. Pushchino, 1992. P. 20.

14. Семенов В.Е. Метаболитная авторегуляция светоиндуцируемой белоксинтезирующей системы и функциональной активности хлоропласта // Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. М.: Наука, 1975. С. 135.
15. Семенов В.Е., Шитова Л.А. Способ отбора регуляторных мутантов фотосинтезирующих микроводорослей и штамм водоросли *Chlorella sp.* — продуцент углеводов: А.с. № 1654337 // БИ. 1991. № 21.
16. Семенов В.Е., Шитова Л.А. 2-дезоксид-Д-глюкоза-резистентный мутант *Chlorella* с нарушенной системой метаболитной регуляции экспрессии генома хлоропласта // 16 конф. ФЕБО. 1984. С. 253.
17. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / Под ред. В.Е. Семенова. М., 1991. 226 с.
18. Владимирова М.Г., Семенов В.Е. Интенсивное культивирование водорослей. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 58 с.
19. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Ann. Chem. 1956. V. 28. P. 350.
20. Пронина Н.А., Семенов В.Е. Локализация мембранносвязанной и растворимой форм карбоангидразы в клетках хлореллы // Физиология растений. 1984. Т. 31. Вып. 3. С. 241.

Представлено В.С. Дзюбенко

Поступила в редакцию  
20.VII.1992

V.E. SEMENENKO, L.A. SHYTOVA, T.S. RUDOVA, N.A. PRONINA

REGULATORY 2-DEOXY-D-GLUCOSE RESISTANT MUTANTS  
OF *CHLORELLA* DEFICIENT IN THE SYSTEM OF NEGATIVE  
METABOLITE REGULATION OF CHLOROPLASTIC GENOME  
EXPRESSION BY FINAL PRODUCTS OF PHOTOSYNTHESIS

*K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology,  
of Russian Academy of Sciences, Moscow*

A method is described of obtaining and selecting spontaneous and UV-induced regulatory mutants of *Chlorella* cells deficient in the system of negative metabolite regulation of chloroplastic genome expression where glucose as a final product of photosynthetic reduction of carbon acts as a negative effector. The method includes two stages:

1) 2-deoxy-D-glucose resistant ( $2dDG^{Res}$ ) mutants tolerant to suppressing action of the stereochemical analogue of glucose are selected; 2) out of  $2dDG^{Res}$ -mutants the forms are selected in which the resistance rests with the disturbance of exogenous glucose transport into the cell ( $2dDG^{ResGT}$ -mutants) and the forms where glucose transport is not disturbed and the resistance is caused by a deficiency in the mechanisms of regulatory action of glucose in the chloroplasts ( $2dDG^{ResCRS}$ -mutants). The properties of CRS-mutants were characterized. It was shown that by contrast with the original strain of *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, glucose analogues ( $2dDG$ ) do not suppress the growth of CRS-mutant culture, photosynthetic evolution of oxygen, biosynthesis of chlorophyll and synthesis of membrane-bound chloroplastic carbonic anhydrase therein. CRS-mutants are superproducers of assimilates and when the division of cells is blocked the accumulation of carbohydrates exceeds that in the original form by 30—40%. It is concluded that the CRS-mutants are deficient in the intrachloroplastic «feed-back» mechanism (glucose effect) of the metabolite regulation of photosynthetic genes, which normally (in the original culture) restricts superproduction of structural proteins, enzymes and assimilates in the chloroplast.