

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

Шерстнева Оксана Николаевна

**РОЛЬ СДВИГОВ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH В ВЫЗВАННОЙ
ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ПЕРЕХОДНОЙ ИНАКТИВАЦИИ
ФОТОСИНТЕЗА**

03.01.02 — биофизика (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Сухов В.С.

Нижний Новгород – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Электрические сигналы у высших растений	10
1.1.1. Потенциал действия	11
1.1.2. Вариабельный потенциал	12
1.2. Влияние электрических сигналов на активность фотосинтеза	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1. Объекты исследования	30
2.1.1. Интактные растения.....	30
2.1.2. Изолированные протопласты	30
2.1.3. Изолированные хлоропласты	31
2.2. Методы исследования.....	32
2.2.1. Регистрация электрической активности растений	32
2.2.2. Регистрация фотосинтетической активности растений.....	34
2.2.3. Оценка скорости поглощения кислорода протопластами	36
2.2.4. Флуоресцентный анализ изменений pH	37
2.2.5. Ингибиторный анализ	39
2.2.6. Математическое моделирование	41
2.3. Статистическая обработка результатов	42
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛОКАЛЬНОГО ОЖОГА И ВЫЗВАННОГО ИМ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	43
ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ H^+ -АТФАЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ВЫЗВАННОГО ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА	52

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ РОЛИ СДВИГОВ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH В РАЗВИТИИ ВЫЗВАННОГО ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА	58
5.1. Анализ динамики внутри- и внеклеточной концентрации ионов H^+ при развитии переменного потенциала.....	58
5.2. Оценка влияния сдвига внутриклеточного pH на параметры фотосинтеза на модельных системах различного уровня.....	62
5.3. Анализ путей влияния изменений внутри- и внеклеточного pH на фотосинтетические процессы при генерации переменного потенциала	69
5.4. Теоретический анализ участия изменений внутри- и внеклеточного pH в развитии вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа	77
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

A_{CO_2} – ассимиляция CO_2

АТФ – аденозинтрифосфат

ВП – переменный потенциал

КЦХФГ – карбонил цианид м-хлорфенилгидразон

НАДФ⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

ПД – потенциал действия

СП – системный потенциал

$\mathcal{E}_л$ – электрод, контактирующий с листом растения

ЭС – электрический сигнал

$\mathcal{E}_{ср}$ – электрод сравнения

$\mathcal{E}_{ст}$ – электрод, контактирующий со стеблем растения

ВЕСЕФ,АМ – 2',7'-бис-(карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеина
ацетоксиметилловый эфир

BSA – бычий сывороточный альбумин

FITC-dextran – флуоресцеин изотиоцианат-декстран

NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции

Tic62 – одна из субъединиц транслокатора внутренней мембраны тилакода
(translocon at the inner envelope of chloroplasts)

TROL – роданаза-подобный белок тилакоидов (thylakoid rhodanese-like protein)

$\gamma(I)$ – квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы I

$\gamma(II)$ – квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II

λ_{em} – длина волны флуоресценции

λ_{ex} – длина волны возбуждения

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Формирование системного ответа растения на локальное действие раздражающих факторов требует развитой системы стрессовой сигнализации. Одним из путей передачи информации о действии умеренных или повреждающих стимулов является генерация и распространение электрических сигналов (ЭС), представленных у высших растений потенциалом действия (ПД), вариабельным потенциалом (ВП) и системным потенциалом (СП).

ЭС вносят существенный вклад в формирование быстрых комплексных изменений функционального состояния растения в стрессовых условиях, в том числе в частях растения, не подвергавшихся раздражению (Pena-Cortes et al., 1995; Stankovic, Davies, 1996; Dziubinska et al., 2003; Hlavackova et al., 2006; Grams et al., 2009; Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012). Большой интерес представляет регуляция электрическими сигналами фотосинтетических процессов, которая может приводить к изменению продуктивности и устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды. При этом достаточно противоречивыми являются данные о механизмах влияния ЭС на фотосинтетическую активность.

Ряд исследователей (Krupenina, Bulychiev, 2007) связывает развитие фотосинтетических изменений при ЭС с входом в цитоплазму и строму ионов Ca^{2+} , которые способны ингибировать ферменты цикла Кальвина (Wolosiuk et al., 1993; Johnson et al., 2006). Эта гипотеза хорошо согласуется с данными о входе ионов Ca^{2+} при развитии ЭС (Fromm, Lautner, 2007; Zimmermann, Felle, 2009; Furch et al., 2009; Vodeneev et al., 2015). В то же время, экспериментальная проверка этой гипотезы на высших растениях проводилась лишь в отдельных работах (Grams et al., 2009), которые не показали влияния внешнего Ca^{2+} на фотосинтез изолированных хлоропластов. С другой стороны, развитие фотосинтетического ответа может быть связано с изменениями внутри- и внеклеточного pH (Grams et al., 2009), которые наблюдаются при генерации ЭС

(Grams et al., 2009; Zimmermann, Felle, 2009; Воденеев и др., 2011). В пользу этого говорит зависимость квантового выхода фотосистемы II от pH среды выделения хлоропластов кукурузы (Grams et al., 2009).

Однако остаётся дискуссионным вопрос о путях влияния сопровождающих генерацию ЭС сдвигов внутри- и внеклеточной концентрации протонов на фотосинтетические процессы. В частности, один из них, по-видимому, связан с вызванной электрическими сигналами инактивацией темновых реакций фотосинтеза (Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012, 2014), что приводит к снижению потока электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи и росту нефотохимического тушения флуоресценции. В то же время, в условиях низкой активности цикла Кальвина также наблюдалось подавление световых реакций (Sukhov et al., 2012), что говорит в пользу возможности непосредственного влияния ЭС на световую стадию фотосинтеза, однако участие изменений внутри- и внеклеточного pH в этом процессе не исследовано.

Таким образом, исследование путей влияния локальных стресс-факторов и индуцируемых ими ЭС на фотосинтетические процессы у растений позволит раскрыть механизмы формирования функционального ответа и повышения устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов внешней среды.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является анализ участия изменений внутри- и внеклеточного pH в развитии индуцированного переменным потенциалом ответа фотосинтеза у высших растений.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследование влияния локального ожога и вызванного им переменного потенциала на фотосинтетические процессы у высших растений
2. Выявление роли H^+ -АТФазы в формировании вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа
3. Анализ динамики внутри- и внеклеточной концентрации ионов H^+ при развитии переменного потенциала

4. Оценка влияния сдвига внутриклеточного рН на параметры фотосинтеза на модельных системах различного уровня

5. Анализ путей влияния изменений внутри- и внеклеточного рН на фотосинтетические процессы при генерации переменного потенциала

Научная новизна работы

Определены величины изменений рН, сопровождающих развитие индуцированного локальным ожогом переменного потенциала, у проростков гороха.

Имитация закисления цитоплазмы при генерации электрической реакции вызывает снижение активности фотосинтеза, которое проявляется в уменьшении квантовых выходов фотохимических реакций фотосистем I и II и росте нефотохимического тушения флуоресценции, что соответствует изменениям данных параметров при индукции ВП.

Впервые выявлено два пути влияния сопровождающих генерацию ВП изменений концентрации протонов на фотосинтетические процессы. Один из них связан с обратимым увеличением рН апопласта и проявляется в изменении активности темновых реакций фотосинтеза; второй путь обусловлен переходным закислением цитоплазмы, которое вызывает рост нефотохимического тушения флуоресценции.

Предложена схема участия изменений внутри- и внеклеточного рН в развитии фотосинтетического ответа при ВП.

Научно-практическая значимость работы

Полученные результаты вносят значительный вклад в понимание роли ЭС в развитии ответных реакций растений, в частности, способствуют раскрытию механизмов преобразования ВП в функциональный ответ.

Разработанная схема возможных путей участия протонов в развитии вызванных переменным потенциалом изменений фотосинтетической

активности может послужить основой для разработки методов модификации продуктивности сельскохозяйственных растений.

Основные результаты и выводы будут использованы в учебном процессе при разработке спецкурсов для студентов ВУЗов и аспирантов биологического профиля.

Собственный вклад автора в исследования

Автор лично принимал участие в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов, а также в подготовке научных статей и докладов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Снижение активности фотосинтеза при распространении вызванного локальным ожогом переменного потенциала связано со сдвигами pH, которые имеют место при генерации ВП.

2. Выявлено две компоненты индуцированного ВП фотосинтетического ответа, одна из которых связана с изменениями газообмена и зависит от динамики внеклеточного pH, а другая обусловлена изменениями pH внутри клетки и проявляется в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международной конференции «Биосистема: от теории к практике» (Пушино, 2013); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); Годичном собрании Общества физиологов растений и Международной научной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); VII Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2014); IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная

сигнализация у растений» (Казань, 2016); 3rd and 4th International symposium of plant signaling and behavior (Париж, 2015; Санкт-Петербург, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 6 – статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ (контракт № 6.2050.2014/К), Российского научного фонда (проект №14-26-00098) и Российского фонда фундаментальных исследований.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста и содержит 30 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 152 источников, из них 132 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Электрические сигналы у высших растений

Для системного ответа всех частей организма на действие локальных раздражителей высшие растения генерируют химические, гидравлические и электрические сигналы, которые могут распространяться в нераздражённые части растения и координировать физиологические процессы, вызывая функциональные изменения на уровне целого организма (Huber, Bauerle, 2016).

Значительную роль в стрессовом ответе играют электрические сигналы, представленные потенциалом действия (ПД), вариабельным потенциалом (ВП) и системным потенциалом (СП). ПД является наиболее изученным электрическим сигналом, широко встречающимся у растений разных групп, в том числе мхов (Koselski et al., 2008), водорослей (Zimmermann, Beckers, 1978; Wacke, Thiel, 2001; Johnson et al., 2002; Krupenina, Bulychov, 2007; Shepherd et al., 2008; Булычев, Комарова, 2014), высших растений (Fromm, Bauer, 1994; Воденеев и др., 2006; Trebacz et al., 2006; Felle, Zimmermann, 2007; Fromm, Lautner, 2007; Пятыгин и др., 2008; Zhao et al., 2015). ПД представляет собой импульсное изменение мембранного потенциала в сторону деполяризации и возникает главным образом при действии неповреждающих стимулов. В частности, индуктором развития ПД может выступать механическое воздействие (Vodeneev et al., 2007; Shepherd et al., 2008; Degli Agosti, 2014), охлаждение (Fromm, Bauer, 1994; Опритов и др., 2005; Воденеев и др., 2006; Krol et al., 2006), электрическая стимуляция (Krol et al., 2006; Favre, Degli Agosti, 2007; Булычев, Крупенина, 2010; Kisnieriene et al., 2016), резкое изменение освещения (Trebacz, Sievers, 1998; Пикуленко, Булычев, 2005), а также некоторые химические вещества (Felle, Zimmermann, 2007; Kupisz, Trebacz, 2011). Под ВП понимают распространяющийся электрический сигнал, наблюдающийся только у высших растений, также представляющий собой обратимую деполяризацию мембраны и развивающийся в ответ на повреждение (Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2015; Huber, Bauerle, 2016). СП представляет

собой обратимую гиперполяризацию плазматической мембраны, развивающуюся в ответ на действие стимулов различной природы (Fromm, Eshrich, 1993; Lautner et al., 2005; Zimmermann et al., 2009). Считается, что развитие СП обусловлено обратимой активацией H^+ -АТФазы плазматической мембраны. На данный момент механизмы генерации и распространения СП, а также его функциональная роль остаются слабо изученными и требуют дальнейших исследований.

1.1.1. Потенциал действия

Под ПД понимают самораспространяющуюся электрическую реакцию длительностью порядка секунд – десятков секунд (Пятыгин и др., 1999; Опритов и др., 2002; Favre et al., 2001). ПД подчиняется принципу "всё или ничего" и характеризуется постоянной амплитудой и скоростью распространения. В настоящее время известно, что у высших растений генерация ПД запускается активацией потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и входом ионов Ca^{2+} в клетку из апопласта (Felle, Zimmermann, 2007; Fromm, Lautner, 2007); кроме того, рост внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} может быть обусловлен их выходом из органелл (Wacke, Thiel, 2001; Krol et al., 2004). В ответ на увеличение концентрации Ca^{2+} открываются Ca^{2+} -зависимые анионные каналы и ионы Cl^- выходят из клетки по электрохимическому градиенту (Lewis et al., 1997; Huber, Bauerle, 2016). С другой стороны, рост внутриклеточного содержания Ca^{2+} вызывает обратимую инактивацию H^+ -АТФазы (Fisahn et al., 2004; Воденеев и др., 2006; Воденеев и др., 2010). В результате обоих процессов формируется фаза деполяризации плазматической мембраны. Изменение потенциала на мембране приводит к активации потенциал-зависимых K^+ -каналов, что обуславливает начало развития фазы реполяризации. В то же время, реполяризация мембраны сопровождается снижением концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и реактивацией H^+ -АТФазы плазматической мембраны, что также вносит вклад в восстановление мембранного потенциала до начального уровня.

Распространение ПД у высших растений происходит электротонически по проводящим пучкам (Fromm, Lautner, 2007; Sukhov et al., 2011; Zhao et al., 2015; Hedrich et al., 2016). В литературе рассматриваются 2 основных канала распространения ПД: ситовидные элементы флоэмы (Dziubinska, 2003; Fromm, 2006) и симпласт возбудимых клеток проводящих пучков (Оприлов и др., 1991; Sibaoka, 1991; Sukhov et al., 2011). Согласно экспериментальным данным, генерация ПД возможна у обоих типов клеток (Оприлов и др., 1991; Sibaoka, 1991; Fromm, 2006). Существуют теоретические работы (Сухов и др., 2011), показывающие возможность совместного участия симпласта паренхимных клеток и ситовидных элементов в распространении ПД. Также нельзя исключать, что вклад двух этих компонент может отличаться у разных растений. Косвенным аргументом в пользу этого является тот факт, что скорость распространения ПД сильно варьирует у растений различных видов от 0,5 до 20 мм/с и более (Volkov, Naack, 1995; Sukhov, 2016; Huber, Bauerle, 2016; Choi et al., 2016).

1.1.2. Вариабельный потенциал

ВП возникает преимущественно в ответ на стимулы, повреждающие ткани растения, такие как ожог (Julien et al., 1991; Stankovic et al., 1997; Hlavackova et al., 2006; Zimmermann, Felle, 2009; Воденев и др., 2011; Vodenev et al., 2012; Sukhov et al., 2012; Galle et al., 2013; Katicheva et al., 2015), механическое воздействие (Stahlberg, Cosgrove, 1996; Meyer, Weisenseel, 1997; Stahlberg et al., 2006), повреждение под действием биотических факторов (Maffei, Bossi, 2006; Zimmermann et al., 2016) и др. Стоит отметить, что длительность фазы деполяризации ВП характеризуется большой вариабельностью: от секунд, что сопоставимо с фазой деполяризации ПД, до нескольких минут (Stahlberg et al., 2006; Vodenev et al., 2015; Huber, Bauerle, 2016). Фаза реполяризации вариабельного потенциала имеет большую длительность (минуты – десятки минут) (Stahlberg et al., 2006; Воденев и др., 2011; Vodenev et al., 2012). Кроме того, ВП может включать в себя "ПД-образные" спайки, представляющие собой

импульсные изменения мембранного потенциала, в некоторых случаях наблюдающиеся на фоне медленной волны деполяризации (Vodeneev et al., 2015). В отличие от ПД, ВП способен распространяться через участки мёртвой или физиологически неактивной ткани (Fromm, Lautner, 2007) и развиваться в период абсолютной рефрактерности для ПД (Stahlberg et al., 2006). Кроме того, ВП характеризуется зависимостью величины ответа от интенсивности повреждающего стимула (Оприлов и др., 1991; Stahlberg et al., 2006), а его амплитуда и скорость распространения снижаются по мере удаления от зоны стимуляции (Stahlberg et al., 2005; Vodeneev et al., 2012, 2015). В силу этого средняя скорость распространения ВП ниже, чем у ПД и обычно составляет порядка мм/с и менее (Grams et al., 2009; Vodeneev et al., 2012, Sukhov et al., 2012; Galle et al., 2013; Huber, Bauerle, 2016; Surova et al., 2016a; Choi et al., 2016).

Данные особенности свидетельствуют в пользу того, что механизм распространения ВП отличается от механизма распространения ПД. В настоящее время активно рассматриваются две гипотезы, объясняющие распространение переменного потенциала. В соответствии с обеими гипотезами ВП не является самораспространяющимся электрическим сигналом, а представляет собой локальное изменение мембранного потенциала в ответ на действие сигнала гидравлической или химической природы, распространяющегося из зоны повреждения (Malone, 1994; Mancuso, 1999; Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2015). Первая гипотеза предполагает (Mancuso, 1999; Stahlberg et al., 2006), что фактором, индуцирующим электрическую реакцию, является распространяющаяся по сосудам ксилемы гидравлическая волна, которая возникает вследствие повышения гидравлического давления в зоне повреждения. В пользу этой гипотезы говорят данные ряда работ (Malone, 1992; Stahlberg, Cosgrove, 1997; Stankovic et al., 1998; Mancuso, 1999; Vodeneev et al., 2012), из которых следует, что локальное повреждение вызывает изменения толщины листа или стебля, опережающие развитие электрической реакции (Malone, 1992; Stankovic et al., 1998; Mancuso, 1999; Vodeneev et al., 2012). Кроме того, искусственное повышение давления в ксилеме индуцирует развитие

электрической реакции, сходной с ВП (Stahlberg, Cosgrove, 1996, 1997; Stahlberg et al., 2006). Такие результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что гидравлическая волна является ключевым фактором, обуславливающим распространение ВП. Однако скорость распространения гидравлической волны существенно превышает скорость прохождения ВП по растению (Vodenееv et al., 2012, 2015). В качестве объяснения такого несоответствия, Stahlberg и Cosgrove (1997) предположили, что генерация ВП связана с изменением тургора живых клеток, окружающих сосуды ксилемы, который изменяется вследствие выхода из неё жидкости. При этом скорость выхода жидкости из ксилемы зависит от градиента давления и снижается по мере удаления от зоны повреждения.

В соответствии с другой гипотезой, в качестве распространяющегося по растению фактора, вызывающего деполяризацию мембраны, может выступать химический агент, т.н. "раневое вещество" или "фактор Рикка" (Ricca, 1916; Опритов и др., 1991; Malone, 1996). В соответствии с ней в зоне повреждения синтезируется и (или) высвобождается некое вещество, которое распространяется по сосудам ксилемы и индуцирует локальный электрический ответ клеток. В качестве такого вещества могут выступать компоненты разрушенных при повреждении клеточных стенок, в частности, олигосахариды (Bishop et al., 1981), а также этилен (O'Donnell et al., 1996; Dziubinska et al., 2003), системин (Pearce et al., 1991; Pena-Cortes et al., 1995), салициловая (Dempsey et al., 1999), абсцизовая (Pena-Cortes et al., 1995; Leon et al., 2001), жасмоновая (Farmer, Ryan, 1990; Hlavinka et al., 2012) кислоты, пероксид водорода (Mittler et al., 2011; Vodenееv et al., 2015). Помимо проблемы природы раневого вещества, классический вариант этой гипотезы не может объяснить скорость распространения ВП. С одной стороны, в случае распространения вещества вместе со стоком воды в ксилеме невозможно базипетальное распространение сигнала; с другой стороны, перемещение вещества с помощью молекулярной диффузии представляется маловероятным, так как скорость распространения вещества в таких условиях существенно ниже скорости прохождения ВП.

Учитывая неполное соответствие обеих гипотез фактам, в настоящее время предполагаются комплексные механизмы распространения из зоны повреждения вызывающего генерацию ВП сигнала (Malone, 1994; Vodeneev et al., 2012, 2015). В частности, согласно Malone (1994), вызванный повреждением гидравлический сигнал может распространяться по растению, перенося с собой химические вещества, которые способны вызывать генерацию ВП. С другой стороны, в ряде работ (Vodeneev et al., 2012, 2015; Sukhov et al., 2013) была высказана гипотеза о турбулентной диффузии раневого вещества из зоны повреждения. В пользу данной гипотезы свидетельствуют теоретические данные (Roth, 1996) о сложном и разнонаправленном характере движения водных потоков в ксилеме, а также ряд работ (Rodes et al., 1999; Vodeneev et al., 2012), которые показали возможность быстрого распространения химических соединений по растению (скорость такого распространения сопоставима со скоростью ВП).

Помимо проблемы механизма распространения ВП, достаточно дискуссионным остается вопрос о механизме его генерации. В литературе имеются данные, что развитие ВП сопровождается закислением цитоплазмы и защелачиванием апопласта (Grams et al., 2009; Zimmermann, Felle, 2009; Воденеев и др., 2011). При этом амплитуда изменений pH варьирует в широком диапазоне; в частности, сдвиг pH апопласта составляет до 0,7 единиц (Zimmermann, Felle, 2009; Grams et al., 2009), а амплитуда снижения pH цитоплазмы достигает 0,6 единиц (Grams et al., 2009). Стоит отметить, что динамика изменений pH была сходна с динамикой электрического ответа (Воденеев и др., 2011).

Наиболее вероятным механизмом таких изменений является обратимая инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны (Davies, 2006; Stahlberg et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Vodeneev et al., 2015), что подтверждается данными ингибиторного анализа с использованием ингибиторов метаболизма (CN^- , NaN_3) на растениях разных видов (Julien, Frachisse, 1992; Воденеев и др., 2011). В частности, при действии таких ингибиторов наблюдалось существенное снижение амплитуды и скорости развития ВП. Использование специфического ингибитора H^+ -АТФазы ортованадата натрия также вызывало снижение амплитуды ВП и

уменьшение скорости его деполяризации и реполяризации, при этом наблюдалось существенное подавление фазы реполяризации (Katicheva et al., 2014). Участие инактивации H^+ -АТФазы косвенно подтверждается и снижением амплитуды ВП при действии протонофора КЦХФГ (карбонил цианид м-хлорфенилгидразон), который повышает проницаемость мембраны для ионов H^+ (Julien et al., 1991; Julien, Frachisse, 1992). Кроме того, закисление внеклеточной среды до 4 ед. рН, значительно увеличивающее электрохимический протонный градиент, что, по-видимому, снижало исходную активность H^+ -АТФазы, уменьшало амплитуду вызванного ожогом ВП на 56 % по сравнению с контролем (Julien et al., 1991). Таким образом, инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны является, по-видимому, ключевым механизмом развития ВП, однако нельзя исключать возможности участия ионных каналов в данном процессе.

Данные об участии пассивных потоков ионов в генерации ВП противоречивы (Stahlberg, Cosgrove, 1992; Katicheva et al., 2014). В частности, в работе Stahlberg и Cosgrove (1992) было показано отсутствие изменений величины входного сопротивления при генерации ВП у проростков гороха, что было интерпретировано в пользу отсутствия существенного вклада пассивных потоков ионов в деполяризацию мембраны при ВП. Однако позднее (Stahlberg et al., 2006) было высказано предположение, что общее изменение данного параметра является результатом одновременного увеличения проводимости ионных каналов и снижения проводимости протонной АТФазы плазматической мембраны, т.е. общее изменение сопротивления мембраны может быть слабо выраженным вследствие взаимной компенсации этих процессов. Следствием этого может быть разная выраженность и направленность изменений сопротивления при ВП у разных видов растений. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты экспериментов на проростках пшеницы (Katicheva et al. 2014), которые показали, что развитие ВП сопровождается значительным снижением величины входного сопротивления, при этом резкий спад сопротивления совпадал по времени с началом деполяризации мембраны, а медленное его восстановление

наблюдалось во время фазы реполяризации. Такой результат говорит о вероятном участии изменения активности ионных каналов в генерации ВП.

Также в ряде работ (Julien et al., 1991; Stahlberg, Cosgrove, 1996; Lautner et al., 2005; Воденеев и др., 2011; Katicheva et al. 2014) возможность участия пассивных потоков ионов в развитии ВП анализировалась с использованием ингибиторного анализа. При этом в работе Julien et al. (1991) было показано, что развитие фазы реполяризации не сопровождалось изменением проницаемости плазматической мембраны для ионов Cl^- и K^+ . Кроме того, по данным Stahlberg и Cosgrove (1996) предварительная обработка блокатором калиевых каналов не влияла на параметры вариабельного потенциала у гороха. В то же время, в других работах (Воденеев и др., 2011; Katicheva et al., 2014) показано, что предобработка блокатором анионных каналов существенно снижает амплитуду ВП и скорость деполяризации. Добавление блокатора калиевых каналов снижало скорость реполяризации мембраны у пшеницы (Katicheva et al., 2014). При анализе влияния активности ионных каналов на количество "ПД-образных" спайков, сопровождающих фазу реполяризации (Rousset et al., 2002) было показано, что отсутствие ионов K^+ и Na^+ в среде, омывающей гипокотиль проростка томата, не влияло на параметры медленной волны деполяризации при ВП и количество спайков. Ингибиторы анионных каналов DIDS и нифлумовая кислота также не оказывали существенного влияния на параметры ВП. Однако в той же работе было показано, что добавление в раствор сульфат ионов, имеющих большее сродство к анионным каналам, чем ионы Cl^- , полностью угнетало развитие спайков. Об участии хлорных каналов в развитии ВП свидетельствуют и данные ряда работ о том, что генерация вариабельного потенциала сопровождается увеличением внешней концентрации ионов хлора (Zimmermann, Felle, 2009; Воденеев и др., 2011). Такие противоречия в результатах исследований можно объяснить различиями в ионных механизмах между разными компонентами ВП (Vodeneev et al., 2015). В частности, активация анионных и калиевых каналов может выступать основным механизмом начальной быстрой деполяризации мембраны при ВП и "ПД-образных" спайков; ключевым механизмом медленной

волны деполяризации, скорее всего, выступает переходная инактивация H^+ -АТФазы (Sukhov et al., 2013; Vodeneev et al., 2015). Существование разных механизмов у различных компонент ВП может объяснять и значительные различия, полученные при анализе параметров переменного потенциала у растений разных видов. Более того, механизмы ВП могут потенциально зависеть от состояния растения и даже от расстояния от зоны повреждения, которые сильно влияют на форму ответа (Воденеев и др., 2011; Sukhov et al., 2013, 2015).

Учитывая ключевую роль входа ионов кальция в цитоплазму в развитии инактивации протонной АТФазы и активации анионных каналов при ПД, можно предположить, что этот же механизм инициирует генерацию ВП (Vodeneev et al., 2015). Действительно, анализ изменений концентрации ионов Ca^{2+} показал, что развитие ВП сопровождается обратимым снижением содержания кальция в апопласте (Zimmermann, Felle, 2009) и его увеличением в цитоплазме (Furch et al., 2009). Использование ингибиторов Ca^{2+} -каналов, а также снижение внешней концентрации ионов Ca^{2+} существенно снижает амплитуду ВП вплоть до полного его подавления (Julien et., 1991; Воденеев и др., 2011; Katicheva et al., 2014, 2015). Также показано, что рост концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, сопровождающий развитие ВП, может вызывать инактивацию H^+ -АТФазы (Stahlberg and Cosgrove, 1992; Воденеев и др., 2011), а также активировать хлорные каналы (Воденеев и др., 2011). Наконец, по данным отдельных работ (Katicheva et al., 2015) локальное повреждение вызывает временную активацию кальциевых каналов (не менее десятков секунд) в неповрежденных частях растения. Важно отметить, что предположение о ключевой роли входа ионов кальция в генерации ВП совместимо с обеими гипотезами о распространении переменного потенциала. Так, механочувствительные Ca^{2+} -каналы рассматриваются как одна из потенциальных мишеней действия гидравлической волны, а активация лиганд-зависимых Ca^{2+} -каналов – вероятный механизм влияния раневого вещества на электрическую активность клеток (Vodeneev et al., 2015).

Таким образом, предположительная последовательность событий при генерации ВП представлена на рис. 1.1 (Katicheva et al., 2014; Vodeneev et al., 2015).

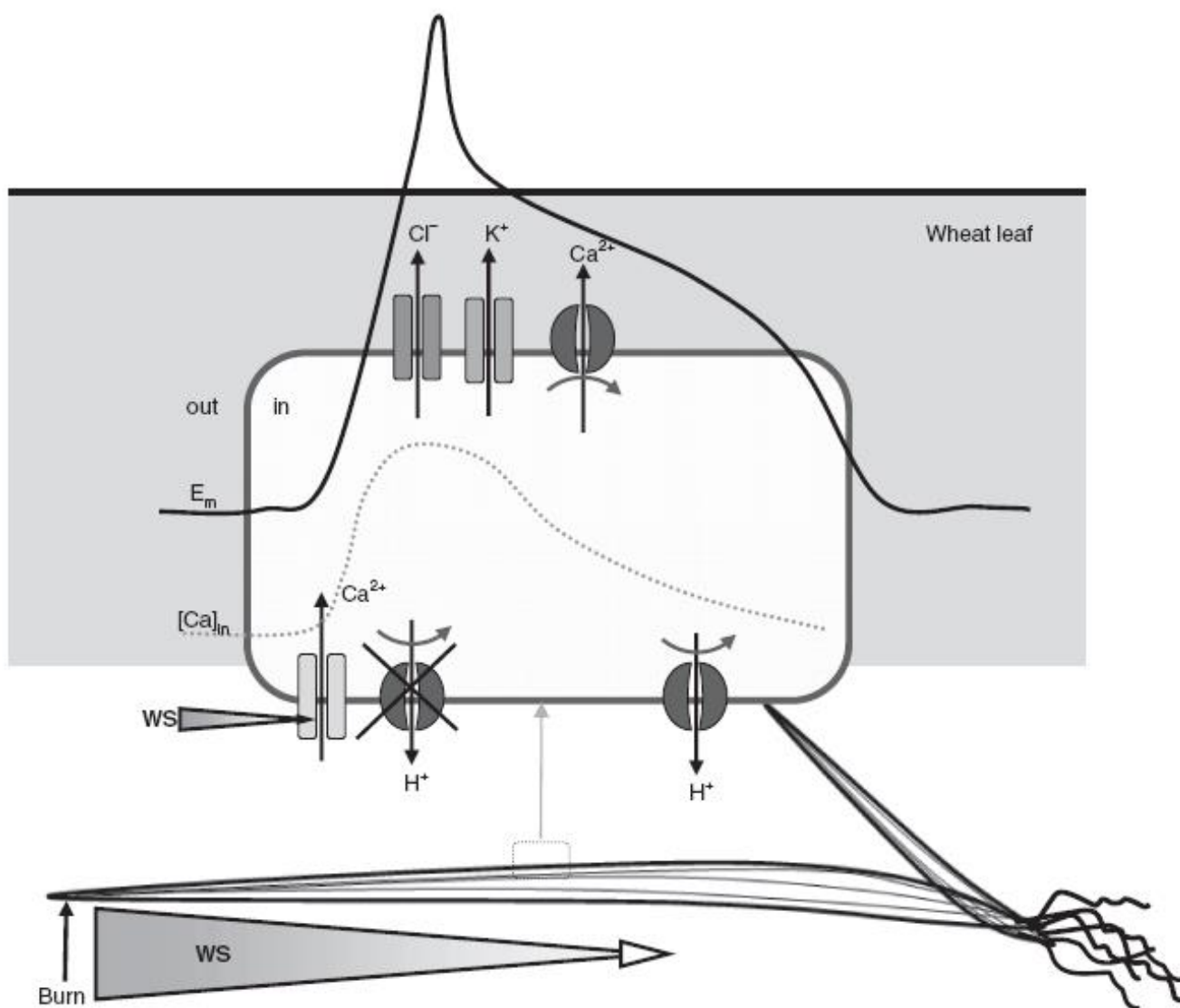


Рис. 1.1. Схема возможного механизма генерации переменного потенциала (Katicheva et al., 2014)

Индукцированный локальным повреждением химический и (или) гидравлический сигнал распространяется из зоны повреждения по растению и вызывает активацию лиганд-зависимых и (или) механочувствительных Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны. Увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке

вызывает инактивацию протонной АТФазы, что приводит к развитию деполяризации мембраны. Высокая концентрация кальция в цитоплазме вызывает, по-видимому, активацию Ca^{2+} -зависимых хлорных каналов и выход хлора из клетки, что также вносит вклад в деполяризацию мембраны и, возможно, может индуцировать появление "ПД-образных" спайков. В дальнейшем происходит инактивация кальциевых каналов и снижение содержания ионов кальция в цитоплазме до исходного уровня. Такое снижение способствует реактивации протонной АТФазы плазматической мембраны и формированию фазы реполяризации. Активация калиевых каналов и выход ионов калия является, по-видимому, еще одним механизмом, вносящим вклад в реполяризацию при ВП.

Стоит отметить, что большая часть расхождений между механизмами генерации ПД и ВП сводится к их количественным различиям, в частности, продолжительности развития реакции и величине концентрационных сдвигов потенциал-формирующих ионов. H^+ и Ca^{2+} , одни из ключевых ионов при генерации электрической реакции, выступают в качестве внутриклеточных сигналов – вторичных мессенджеров. Значительные по продолжительности и величине сдвиги их концентрации в клетке, особенно при ВП, вероятно, могут участвовать в развитии функциональных изменений, в том числе регуляции активности фотосинтетических процессов.

1.2. Влияние электрических сигналов на активность фотосинтеза

Необходимо отметить, что ЭС не являются итоговым ответом растения на действие раздражающих факторов, а играют важную роль в развитии системных изменений. Эта роль в первую очередь сводится к «интеграции» разных частей растительного организма, что позволяет координировать процессы в меняющихся условиях окружающей среды. Механизм такой координации связан с распространением электрических сигналов по растению и развитием различных физиологических ответов на них в интактных частях растительного организма. Так, известно, что ЭС способны индуцировать экспрессию *pin2* генов (Pena-Cortes

et al., 1995; Fisahn et al., 2004), стимулировать продукцию системина, этилена, абсцизовой и жасмоновой кислот (Dziubinska et al., 2003; Fisahn et al., 2004; Hlavackova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012); ингибировать синтез белков (Fromm, Lautner, 2007); подавлять рост стебля растяжением (Fromm, Lautner, 2007); регулировать движение листьев (Sibaoka, 1991; Volkov et al., 2008a, b); регулировать транспирацию и открытость устьиц (Koziolek et al., 2004; Grams et al., 2007; Sukhov et al., 2012); активировать дыхание (Filek, Koscielniak, 1997; Sukhov et al., 2012; Lautner et al., 2014); снижать загрузку метаболитов (Fromm, Bauer, 1994) и транспорт по флоэме (Furch et al., 2010), а также повышать устойчивость целого растения к действию стресс-факторов (Ретивин и др., 1997; Sukhov, 2016). Кроме того, в ряде работ показано, что локальные раздражения и индуцированные ими ЭС могут регулировать активность фотосинтеза (Pena-Cortes et al., 1995; Koziolek et al., 2004; Hlavackova et al., 2006; Krupenina, Bulychiev, 2007; Grams et al., 2009; Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012, 2014; Fromm et al., 2013).

Влияние ЭС на фотосинтез является в настоящее время активно изучаемой проблемой, что связано как с высокой значимостью этого процесса для жизни растения, так и с разнообразием фотосинтетических ответов. Так, в зависимости от типа раздражения и функционального состояния растения в интактных частях растений могут наблюдаться изменения фотосинтетической активности различного характера. В частности, в таких условиях может развиваться быстрая инактивация фотосинтеза (Grams et al., 2009; Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012), длительная инактивация фотосинтеза (Herde et al., 1999; Hlavackova et al., 2006) и активация фотосинтеза (Grams et al., 2007). Кроме того, в ответ на локальный стимул может развиваться многофазный фотосинтетический ответ, включающий в себя изменения активности фотосинтеза разной направленности (Herde et al., 1995; Pena-Cortes et al., 1995; Sukhov et al., 2014).

В ряде работ показано, что развитие потенциала действия (Pavlovic et al., 2011; Vredenberg, Pavlovic, 2013) и вариабельного потенциала (Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2012; Galle et al., 2013; Sukhov et al., 2014) может

сопровождаться быстрыми (порядка минут) изменениями активности фотосинтеза, которые проявляются в снижении уровня ассимиляции CO_2 на свету, росте нефотохимического тушения флуоресценции, а также уменьшении квантовых выходов фотореакций фотосистем I и II, ограничении нециклического потока электронов и усилении циклического потока электронов вокруг фотосистемы I (Grams et al., 2009; Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012; Surova et al., 2016a). В то же время, развитие такого ответа наблюдается не во всех случаях. В частности, в отдельных работах было показано отсутствие быстрой инактивации фотосинтеза при генерации электрических сигналов (Lautner et al., 2005; Hlavackova et al., 2006; Fromm et al., 2013). Стоит отметить качественное сходство ПД- и ВП-индуцированных фотосинтетических ответов, что свидетельствует в пользу общности механизмов влияния различных электрических сигналов на фотосинтетические процессы.

Открытым остаётся вопрос о механизмах развития быстрой инактивации фотосинтеза при генерации электрических сигналов. Одним из наиболее вероятных механизмов является влияние изменений ионных концентраций, сопровождающих развитие ЭС, на фотосинтетические процессы (Krupenina, Bulychев, 2007; Grams et al., 2009; Булычев и др., 2013).

В частности, существует гипотеза (Grams et al., 2009) о ключевой роли изменений pH в клетке и апопласте в развитии быстрой инактивации фотосинтеза при ЭС. Как уже отмечалось, развитие ПД и ВП сопровождается обратимой инактивацией H^+ -АТФазы (Воденеев и др., 2006; Sukhov, Vodeneev, 2009; Katicheva et al., 2014; Vodeneev et al., 2015), а также снижением pH цитоплазмы (Grams et al., 2009) и ростом pH апопласта (Zimmermann, Felle, 2009; Grams et al., 2009). При этом в ряде работ (Grams et al., 2009; Булычев и др., 2013) показано влияние сдвига pH на фотосинтетические процессы. В частности, снижение pH в перфузионном растворе вызывало увеличение нефотохимического тушения флуоресценции у харовых водорослей (Булычев и др., 2013). Кроме того, в работе Grams et al. (2009) показано, что закисление среды инкубации вызывало снижение квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II у хлоропластов

кукурузы. В то же время, анализ действия протонофора (нигерицин) на фотосинтез скорее не подтверждает участие входа протонов в клетку в развитии фотосинтетического ответа у харовых водорослей (Krupenina, Bulyshev, 2007).

В соответствии с другой гипотезой (Krupenina, Bulyshev, 2007), ключевым механизмом формирования вызванного ЭС фотосинтетического ответа может являться обратимое увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, которое сопровождает развитие ЭС (Vodeneev et al., 2015). Так, в отдельных работах показано (Krupenina, Bulyshev, 2007), что имитация входа Ca^{2+} в клетку с использованием ионофора (A23187) вызывает рост нефотохимического тушения флуоресценции, сходный с таковым при индукции электрической реакции. В соответствии с гипотезой авторов, увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме при генерации ЭС стимулирует вход Ca^{2+} в строму. Рост содержания Ca^{2+} в строме способен вызывать инактивацию цикла Кальвина (Wolosiuk et al., 1993; Johnson et al., 2006), индуцируя закисление люмена и усиливая нефотохимическое тушение флуоресценции. В то же время, остаётся открытым вопрос о механизмах влияния кальция на фотосинтез. В частности, рост концентрации ионов Ca^{2+} может напрямую ингибировать работу ферментов цикла Кальвина (Wolosiuk et al., 1993; Johnson et al., 2006). С другой стороны, увеличение внутриклеточного содержания кальция может вызывать активацию Ca^{2+} -зависимых хлорных каналов, а также инактивацию протонной АТФазы плазматической мембраны (Sukhov, Vodeneev, 2009; Vodeneev et al., 2015), что приводит к сдвигу внутри- и внеклеточного pH. В работе Sukhov (2016) было высказано предположение, что прямое и опосредованное действие изменений концентрации кальция на фотосинтез при развитии ЭС могут реализовываться одновременно; при этом вклад этих механизмов в индукцию фотосинтетического ответа может варьировать у разных растений и зависеть от типа электрического сигнала.

В ряде работ показано, что первым этапом развития вызванной ЭС быстрой инактивации фотосинтеза является снижение уровня ассимиляции углекислого газа (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005); при этом величина такого ответа

падает в условиях низкой активности цикла Кальвина (Sukhov et al., 2012, 2014, 2015; Pavlovic et al., 2011). В качестве одного из механизмов, запускающих подавление темновой стадии фотосинтеза, рассматривается влияние повышения концентрации ионов кальция и протонов в строме на активность ферментов цикла Кальвина (Wolosiuk et al., 1993; Krupenina, Bulychiev, 2007). С другой стороны, сопровождающее развитие электрической реакции увеличение pH апопласта может вызывать снижение проводимости мезофилла листа для CO_2 (Galle et al., 2013). Предполагается, что такой эффект может быть связан с изменением активности карбоангидраз (Grams et al., 2009), снижением отношения $\text{CO}_2:\text{HCO}_3^-$ (Sukhov, 2016) и подавлением работы аквапоринов (Galle et al., 2013), однако механизм такого влияния требует дальнейших исследований.

Сопровождающие развитие ЭС быстрые изменения активности световой стадии фотосинтеза могут быть обусловлены инактивацией цикла Кальвина, которая приводит к изменениям концентраций субстратов световых реакций. В частности, рост соотношения АТФ:АДФ может подавлять активность H^+ -АТФ-синтазы тилакоидной мембраны и вызывать закисление люмена и, как следствие, увеличивать нефотохимическое тушение флуоресценции и подавлять нециклический поток электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Kramer et al., 1999; Maxwell, Johnson, 2000; Muller et al., 2001), что стимулирует циклический поток электронов вокруг фотосистемы I (Miyake et al., 2005; Huang et al., 2012; Zivcak et al., 2013; Sukhov, 2016). Кроме того, снижение содержания НАДФ⁺ также подавляет нециклический поток электронов (Pavlovic et al., 2011).

Подавление активности световых реакций фотосинтеза при ЭС может быть обусловлено также процессами, не зависящими от активности цикла Кальвина. В частности, показано, что снижение квантовых выходов фотосистем I и II и рост нефотохимического тушения флуоресценции могут проявляться в отсутствие изменений поглощения углекислого газа (Sukhov et al., 2012, 2014, 2015; Vredenberg, Pavlovic, 2013). В то же время, остаются неясными механизмы такого влияния. С одной стороны (Sukhov, 2016), снижение pH стромы хлоропластов,

которое, вероятно, имеет место при закислении цитоплазмы (Werdan et al., 1975), может вызывать аккумуляцию ферредоксин-НАДФ-редуктазы на тилакоидах в комплексах Tic62 и TROL (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010), нарушая транспорт электронов через акцепторную сторону фотосистемы I. В пользу данного предположения свидетельствует снижение потока электронов через акцепторную сторону фотосистемы I у герани (Sukhov et al., 2012) при развитии переменного потенциала. В то же время, не исключено существование других механизмов развития быстрой инактивации световых реакций фотосинтеза при ЭС.

При развитии электрического сигнала у растений также может наблюдаться длительная инактивация фотосинтеза (Herde et al., 1999; Hlavackova et al., 2006; Sukhov et al., 2014), которая проявляется в снижении уровня ассимиляции CO₂ и квантовых выходов фотореакций фотосистем I и II, а также возрастании нефотохимического тушения флуоресценции. Продолжительность таких изменений сильно варьирует и составляет от десятков минут (Sukhov et al., 2014) до нескольких часов (Herde et al., 1999), при этом максимальная величина ответа обычно достигается через 30-40 минут после генерации электрического сигнала (Sukhov et al., 2014). Длительная инактивация фотосинтеза развивается в ответ на действие как ПД- (Herde et al., 1995), так и ВП-индуцирующих (Herde et al., 1995; Pena-Cortes et al., 1995) стимулов, поэтому представляется вероятным, что оба типа электрических сигналов способны вызывать такой ответ (Sukhov, 2016).

В качестве механизма длительной инактивации фотосинтеза в ответ на повреждение рассматривается увеличение содержания фитогормонов в растении (Herde et al., 1995; Pena-Cortes et al., 1995; Hlavackova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012). В частности, показано (Herde et al., 1995), что индуцированная действием повреждающего стимула продукция и распространение по растению абсцизовой и жасмоновой кислот в нераздражённых частях растения может вызывать снижение активности фотосинтеза. В то же время, эти данные не противоречат гипотезе об участии ЭС в этом процессе (Sukhov, 2016). В частности, показано, что генерация ЭС в нераздражённой зоне опережает увеличение содержания фитогормонов (Hlavackova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012). В связи с этим, при развитии

вызванной локальным раздражением длительной инактивации фотосинтеза возможна следующая цепочка событий (Sukhov, 2016). Индуцированный раздражением электрический сигнал распространяется в интактные части растения и может вызывать в них увеличение концентрации абсцизовой и жасмоновой кислот (Pena-Cortes et al., 1995; Herde et al., 1996, 1999; Hlavackova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012), при этом начало таких изменений наблюдается в среднем через 10 минут после раздражения (Hlavackova et al., 2006). Рост содержания этих фитогормонов вызывает инактивацию фотосинтеза (Herde et al., 1997; Lovelli et al., 2012). В частности, абсцизовая кислота может ингибировать темновую стадию фотосинтеза, снижая проводимость устьиц для CO_2 , а жасмоновая кислота вызывает снижение активности ферментов цикла Кальвина (Sukhov, 2016). Кроме того, в работе Herde et al. (1999) показано длительное увеличение содержания гормонов (около 5 часов после раздражения), которое сопровождалось снижением фотосинтетической активности в том же временном диапазоне, что также свидетельствует в пользу рассматриваемого механизма.

Другим потенциальным механизмом развития вызванной ЭС длительной инактивации фотосинтеза могут служить сдвиги ионных концентраций, в частности, сопровождающие генерацию ПД и ВП изменения pH апопласта и цитоплазмы. В ряде работ показано (Zimmermann, Felle, 2009), что изменения внутри- и внеклеточного pH при развитии электрической реакции могут наблюдаться в течение достаточно продолжительного времени (десятки минут). При этом влияние таких изменений на формирование длительной инактивации фотосинтеза, вероятно, может иметь сходные механизмы с изменениями фотосинтетической активности в минутном диапазоне (Sukhov, 2016). Помимо изменений pH, также не может быть исключено участие в развитии длительной инактивации фотосинтеза ионов кальция, однако, вследствие относительно небольшой продолжительности активности Ca^{2+} -каналов (порядка 30-40 секунд) и, соответственно, входа Ca^{2+} в клетку при генерации ЭС (Katicheva et al., 2015), они могут играть, вероятнее всего, сигнальную роль.

В работе Sukhov (2016) в качестве одного из механизмов длительного снижения фотосинтетической активности при ЭС рассматривается также снижение оттока ассимилятов из клеток мезофилла в ситовидные элементы флоэмы (Ainsworth, Bush, 2011), которое имеет место при генерации электрической реакции (Fromm, Bauer, 1994; Furch et al., 2010). В частности, было выдвинуто предположение, что в развитии длительной инактивации фотосинтеза может участвовать сопровождающее ЭС подавление активности H^+ -сахарозного симпортера (Sukhov, 2016). В то же время, механизмы развития длительной инактивации фотосинтеза при ЭС изучены слабо и требуют дальнейших исследований.

В ряде работ (Grams et al., 2007) показано, что вызванные различными стимулами электрические сигналы могут индуцировать активацию фотосинтеза. В частности, такие изменения фотосинтетической активности наблюдались при ПД, вызванном резкой сменой водного режима, у растений кукурузы (Grams et al., 2007), и после локального нагрева листа (Herde et al., 1995). Обратимая активация фотосинтеза также наблюдалась при локальном повреждении, вызванном действием высокой температуры (Pena-Cortes et al., 1995), что может свидетельствовать в пользу способности переменного потенциала, который, как правило, возникает при действии повреждающих стимулов, вызывать активацию фотосинтетических процессов (Sukhov, 2016). Данные о механизмах активации фотосинтеза при ЭС встречаются лишь в отдельных работах (Herde et al., 1995; Pena-Cortes et al., 1995; Grams et al., 2007) и остаются слабо изученными. Существует предположение (Сухов и др., 2008), что снижение ионной проницаемости тилакоидной мембраны может быть потенциальным механизмом активации фотосинтеза после ЭС, что, однако, требует экспериментальной проверки.

В литературе имеются данные о влиянии электрических сигналов на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию стрессоров (Ретивин и др., 1999а; Sukhov et al., 2014; Sukhov, 2016; Surova et al., 2016а). Так, показано (Ретивин и др., 1999а), что ПД вызывает возрастание устойчивости фотосистемы

II к пониженной (-8°C) и повышенной ($+45^{\circ}\text{C}$) температуре и стимулирует её репарацию после действия стрессоров у проростков тыквы. Механизмы такого влияния недостаточно исследованы, однако предполагается (Sukhov, 2016), что они связаны с имеющими место при развитии ЭС изменениями фотосинтетической активности, в частности, стимуляцией нефотохимического тушения флуоресценции и повышением циклического потока электронов вокруг фотосистемы I. Усиление циклического потока поддерживает транстилакоидную разность pH и синтез АТФ, который стимулирует репарационные процессы фотосистемы II в стрессовых условиях (Allakhverdiev et al., 2005, 2008). ВП также способен оказывать влияние на устойчивость фотосинтетического аппарата, в частности, после генерации переменного потенциала у проростков гороха наблюдалось увеличение степени повреждения фотосистемы II и снижение повреждения фотосистемы I при воздействии высоких температур ($+53^{\circ}\text{C}$) (Sukhov et al., 2014; Surova et al., 2016a). Увеличение устойчивости фотосистемы I может быть связано со снижением активности цикла Кальвина при генерации ВП (Sukhov, 2016), в пользу чего говорит сходство между вызванными переменным потенциалом и подавлением ассимиляции углекислого газа путём снижения концентрации внешнего CO_2 изменениями фотосинтеза и устойчивости фотосистемы I (Sukhov et al., 2014). Индуцированная ВП инактивация цикла Кальвина может усиливать циклический поток электронов вокруг фотосистемы I (Sukhov et al., 2015), вызывать повышение концентрации АТФ в листе (Surova et al., 2016b) и рост нефотохимического тушения флуоресценции (Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012). Предполагается (Sukhov, 2016), что усиление повреждения фотосистемы II после индукции ВП связано с сопровождающей развитие электрической реакции инактивацией протонной АТФазы и, как следствие, закрытием устьиц и снижением уровня транспирации. При воздействии повышенной температуры низкий уровень транспирации способствует более интенсивному нагреву листа и повреждению фотосистемы II. Такое подавление работы фотосистемы II может служить одним из механизмов увеличения устойчивости фотосистемы I (Surova et al., 2016a), что

подтверждается высокой корреляцией между снижением квантового выхода фотосистемы II и ростом квантового выхода фотосистемы I после генерации ВП при прогреве (Surova et al., 2016a). В частности, в результате снижения активности фотосистемы II подавляется транспорт электронов на фотосистему I и снижается вероятность её повреждения активными формами кислорода (Sukhov, 2016), что было показано в ряде работ при прямом действии стресс-факторов на лист (Sonoike, 2011; Tikkanen et al., 2014).

Помимо прямого действия на активность нециклического потока электронов, инактивация цикла Кальвина стимулирует продукцию пероксида водорода (Kim, Portis, 2004), что может активировать экспрессию генов, участвующих в развитии устойчивости растения и, в частности, фотосинтетического аппарата, к стрессовым условиям (Uchida et al., 2002; Hossain et al., 2015).

В обзоре Sukhov (2016) было высказано предположение, что изменение устойчивости фотосинтетического аппарата после генерации ПД и ВП может приводить к наблюдающемуся при ЭС повышению устойчивости на уровне целого растения. В частности, одним из механизмов такого повышения может служить увеличение содержания АТФ в растениях (Ретивин и др., 1999б; Surova et al., 2016b).

Таким образом, ЭС имеют большое значение для функционирования растительного организма в целом. В частности, они участвуют в регуляции фотосинтетических процессов, при этом вызванные ЭС ответы фотосинтеза значимы для развития устойчивости к действию неблагоприятных факторов. Однако остается открытым ряд вопросов. В частности, неясен механизм преобразования ЭС в фотосинтетический ответ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Интактные растения

Исследования проводились на 2-3-недельных интактных проростках гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.). Растения выращивались гидропонным способом на 50 % среде Хоглэнда-Арнона в условиях 16-ти часового светового периода в климатической камере (KBW-240, «Binder») при температуре 24°C.

Для анализа влияния переменного потенциала на фотосинтетическую активность высших растений использовались интактные проростки гороха и тыквы. В отдельной серии экспериментов использовалась модельная система – лист интактного растения, погружённый в водный раствор (0,1 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 0,5 мМ CaCl₂, 20 мМ MES-KOH, pH=6,0).

2.1.2. Изолированные протопласты

Протопласты выделялись из листьев интактных проростков гороха (рис. 2.1) в среде, содержащей 0,4 М сорбит, 20 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 5 мМ MgCl₂, 30 мМ MES-KOH, pH=5,5 (Найдов, 2011). Листья гороха 3 яруса со снятым эпидермисом инкубировались в среде выделения с добавкой 1% целлюлазы, 0,2% пектиназы и 0,2% BSA в течение 2 часов на свету (интенсивность света составляла 41,7 мкМ·м⁻²·с⁻¹) при t=28°C. Затем раствор заменялся на среду выделения без ферментов и BSA и протопласты отделялись от листьев. Полученная суспензия пропусклась через фильтр с диаметром пор 50 мкм) и центрифугировалась 5 минут (30g, 4°C), затем осадок ресуспендировался в среде выделения. Жизнеспособность полученных протопластов оценивалась с помощью светового микроскопа при окрашивании пробы метиленовым синим.

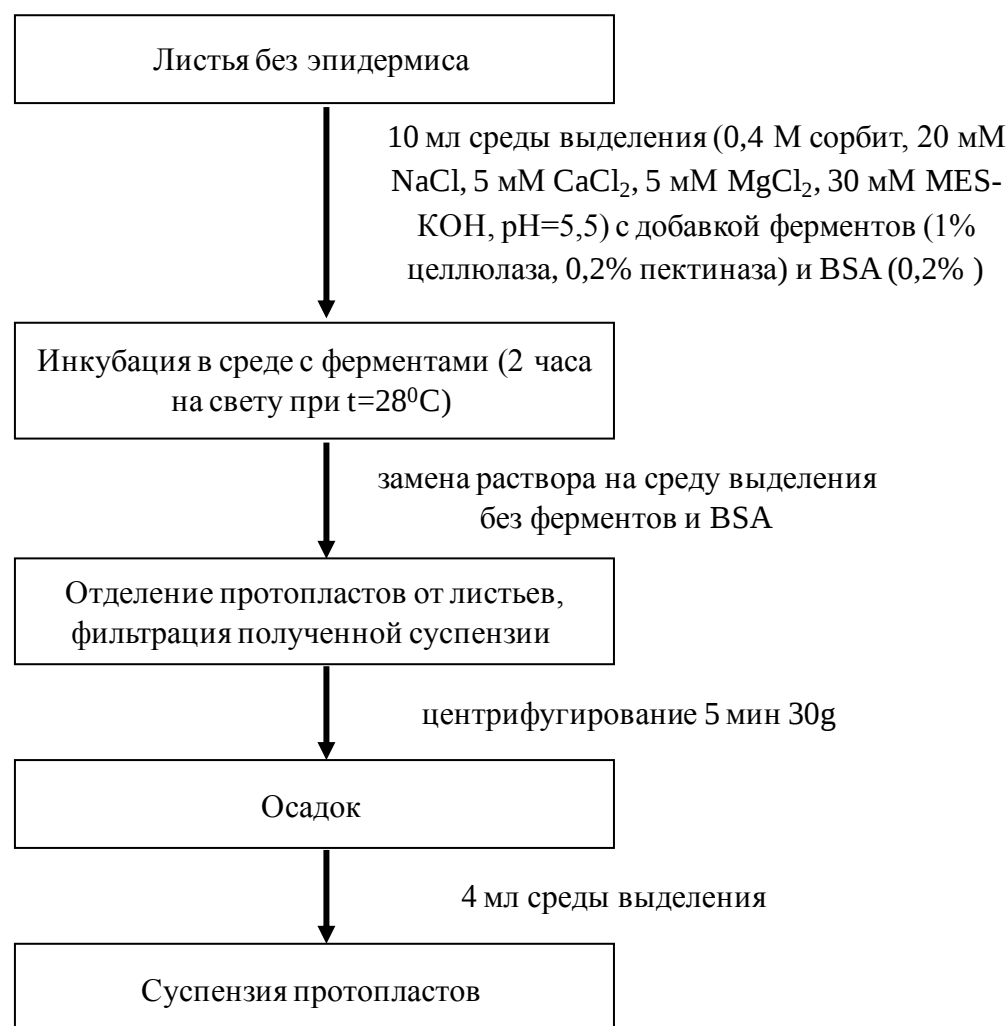


Рис. 2.1. Схема выделения протопластов из листьев гороха

2.1.3. Изолированные хлоропласты

Хлоропласты выделялись из листьев интактных проростков гороха и тыквы с использованием стандартной методики (Egorov, Krasnovsky, 1992) (рис. 2.2). Мелкоизмельчённые листья (2 г) гомогенизировались в 15 мл среды выделения (0,35 М NaCl в 0,06 М фосфатном буфере, pH=6,9). Гомогенат центрифугировался в течение 5 минут (200g), затем полученный супернатант подвергали вторичному центрифугированию в течение 15 минут (2000g). Осаждённые хлоропласты ресуспендировались в 4 мл среды выделения.

Целостность хлоропластов, выделенных данным способом, оценивалась по изображениям, полученным с помощью оптической микроскопии (Carl Zeiss LSM 510 META, «Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

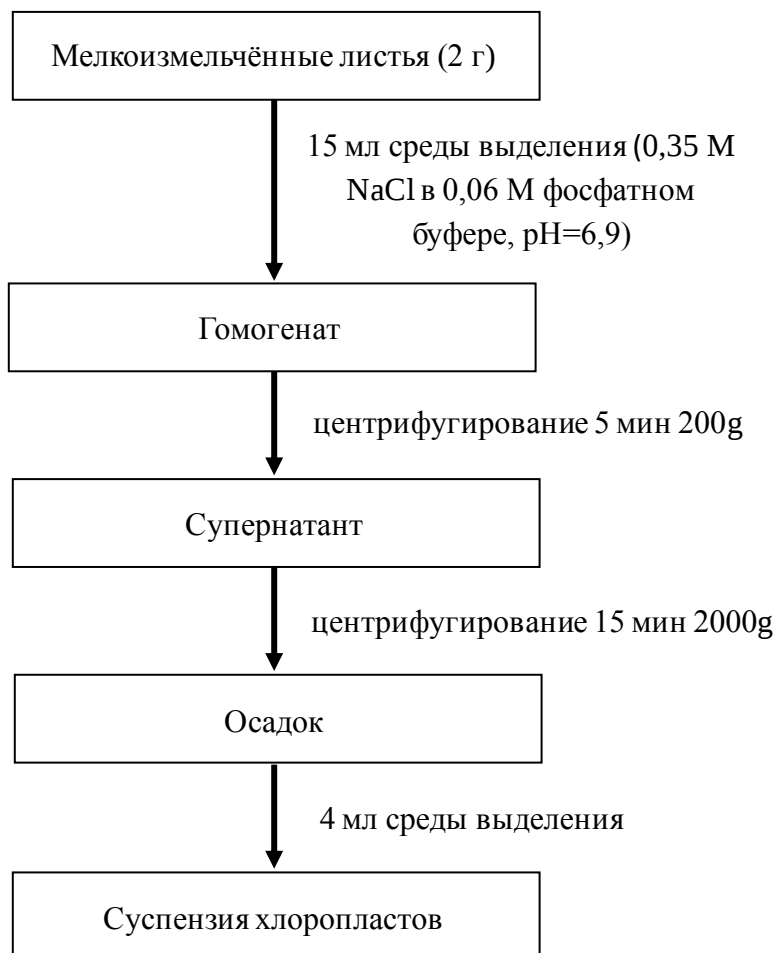


Рис. 2.2. Схема выделения хлоропластов из листьев гороха и тыквы

2.2. Методы исследования

2.2.1. Регистрация электрической активности растений

Поверхностный потенциал (V_s) регистрировался с помощью макроэлектродной техники. Для этого использовалась стандартная установка для экстраклеточного отведения, состоящая из двух пар Ag/AgCl-макроэлектродов ЭВЛ-1МЗ, высокоомного усилителя ИПЛ-113 и ПК. Интактные проростки гороха

и тыквы не менее чем за 1,5 часа до раздражения закрепляли, как показано на рис. 2.3. Электроды приводили в контакт с поверхностью растения через каплю электропроводящего геля. На проростках гороха раздражение наносилось на один из соседних к исследуемому листьев. Первый измерительный электрод ($E_{ст}$) располагался на стебле между местом раздражения и регистрации параметров фотосинтеза, второй измерительный электрод ($E_{л}$) – на листе, парном к исследуемому. В предварительной серии экспериментов мы проводили сравнение параметров электрических реакций в парных листьях у проростков гороха. При этом было показано, что ЭС в парных листьях практически идентичны (значение коэффициента корреляции между амплитудами ВП парных листьев составляло 0,94).

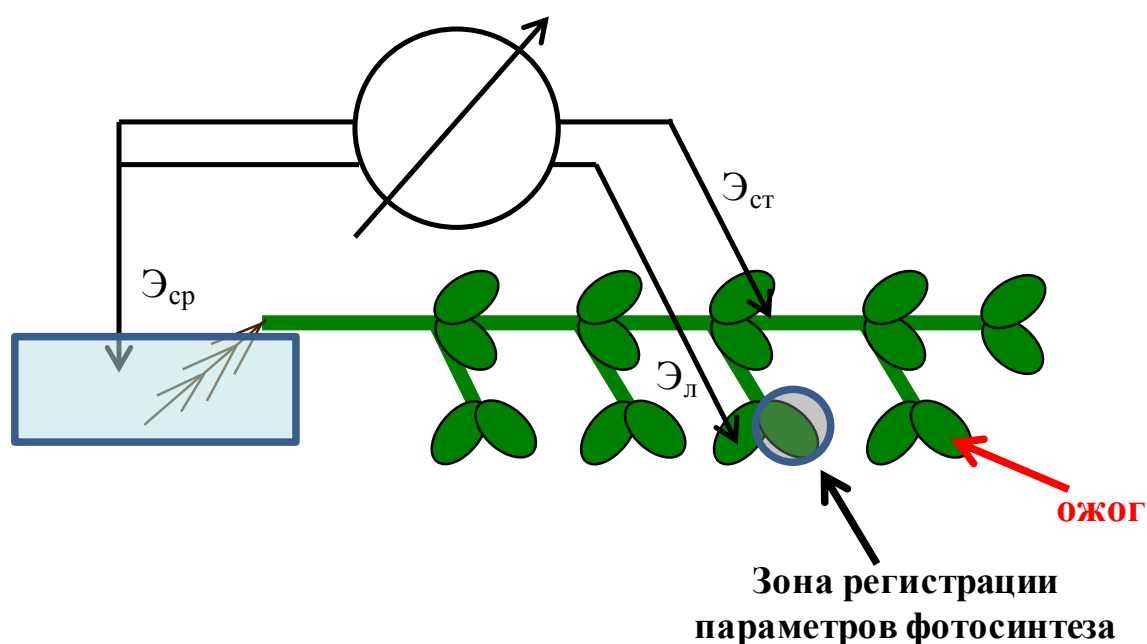


Рис. 2.3. Схема нанесения раздражения, регистрации электрического потенциала и фотосинтетических параметров растения

$E_{ст}$ – электрод, располагающийся на стебле между зоной раздражения и регистрации параметров фотосинтеза; $E_{л}$ – электрод, находящийся на парном к исследуемому листе; $E_{сп}$ – электрод сравнения.

Параметры электрической и фотосинтетической активности оценивались на расстоянии 10 см от зоны ожога на неповреждённом листе.

На проростках тыквы раздражение наносилось на один из семядольных листьев. E_d контактировал с поверхностью листа, на границе с зоной измерения фотосинтеза, $E_{ст}$ – с основанием черешка этого же листа. Электрод сравнения в обоих вариантах эксперимента находился в жидкости, контактировавшей с корнями растения.

При исследовании динамики концентрации протонов в интактных проростках измерительный электрод располагался в зоне регистрации изменений рН. Электрод сравнения находился в жидкости, контактировавшей с корнями растения.

Для индукции переменного потенциала на лист растения наносили ожог открытым пламенем в течение 3 с.

2.2.2. Регистрация фотосинтетической активности растений

Фотосинтетические параметры интактных растений регистрировались с помощью системы, включающей в себя инфракрасный газоанализатор GFS-3000, РАМ-флуориметр Dual-PAM-100 и измерительную головку Dual-PAM gas-exchange Cuvette 3010-Dual (Heinz Walz GmbH, Германия). Данная система использовалась для параллельной регистрации параметров световой и темновой стадий фотосинтеза на неповреждённом листе (рис. 2.3) (исследуемая площадь составляла 1,3 см²). Исследование фотосинтеза модельной системы – листа интактного растения, погружённого в водный раствор, проводилось при помощи измерительного блока Dual-PAM-100 для суспензий, при этом оценивалась только активность световой стадии фотосинтеза.

Параметры F_0 (темновой уровень флуоресценции), F_m (максимальный выход флуоресценции) и P_m (максимальное изменение сигнала Р700 фотосистемы I, отражающий максимальное окисление Р700) определялись через 20 минут темновой адаптации. Текущий уровень флуоресценции (F), максимальный выход флуоресценции на свету (F'_m) и текущий уровень сигнала Р700 (P) и

максимальное изменение сигнала P700 на свету (P'_m) регистрировались с помощью насыщающих вспышек, генерируемых каждые 10 с.

Концентрация внешнего CO₂ составляла 360 мкмоль моль⁻¹ в контрольных условиях и ~ 10-15 мкмоль моль⁻¹ в условиях пониженной концентрации CO₂. Температура листа составляла 23°C, относительная влажность воздуха в кювете – 60%. Интенсивность актиничного света (460 нм) для интактных растений составляла 239 мкмоль м⁻² с⁻¹, интенсивность насыщающих вспышек (635 нм) во всех экспериментах составляла 10000 мкмоль м⁻² с⁻¹, длительность – 300 мс.

Параметры активности световой стадии фотосинтеза суспензий изолированных протопластов и хлоропластов регистрировались с помощью измерительного блока Dual-PAM-100 для суспензий. Темновая адаптация для суспензии протопластов гороха составляла 20 мин, затем определялись параметры F_0 , F_m и P_m , подавались насыщающие вспышки (каждые 20 с) и актиничный свет (239 мкмоль м⁻² с⁻¹). Запись фотосинтетической активности производилась в течение 60 минут. В экспериментах с изолированными хлоропластами длительность темновой адаптации составляла 3 мин (для гороха) и 2 мин (для тыквы). Далее определялись начальные параметры F_0 , F_m и P_m , подавались насыщающие вспышки (каждые 5 с) и актиничный свет (108 мкмоль м⁻² с⁻¹) и производилась регистрация фотосинтетических параметров. Регистрация параметров фотосинтеза производилась в течение 13 минут. Параллельно с записью фотосинтетических параметров протопластов и хлоропластов регистрировался pH суспензии с помощью комбинированного электрода ЭСК-10614 и pH-метра ИПЛ-113.

Квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II ($\gamma(II)$) и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) рассчитывались с помощью Dual-PAM-100 и его программного обеспечения по формулам: $\gamma(II) = (F'_m - F)/F'_m$; $NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$ (Maxwell, Johnson, 2000). Квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы I ($\gamma(I)$) рассчитывался по формуле $\gamma(I) = (P'_m - P)/P_m$ (Klughammer, Schreiber, 2008). Уровень ассимиляции CO₂ (A_{CO_2} ,

мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) рассчитывался с помощью GFS-3000 и его программного обеспечения согласно Von Caemmerer, Farquhar (1981).

2.2.3. Оценка скорости поглощения кислорода протопластами

Измерения скорости поглощения кислорода на свету у суспензии протопластов проводились полярографическим методом с помощью установки, состоящей из прибора для определения концентрации O_2 в суспензиях Oxygraph Plus System (Hansatech, Великобритания) и ПК.

В кювету, расположенную над катодом кислородного электрода, загружались 1 мл среды и 0,2 мл жидкости с протопластами. Между раствором и катодом располагалась мембрана, пропускающая O_2 , и папиросная бумага для равномерного распределения электролита. Для предотвращения оседания протопластов использовалась магнитная мешалка, встроенная в контрольный блок. Поддержание постоянной температуры суспензии во время измерения (25°C) осуществлялось путём прогонки большого объёма воды вокруг кюветы из ёмкости с заданной температурой с помощью перильстатического насоса НП-200 (АЛЬБЕДО, Россия).

Во время измерений поддерживался световой режим, близкий к условиям освещения при исследованиях суспензии протопластов с помощью метода РАМ-флуориметрии (после 20 мин темновой адаптации включался актиничный свет 470 нм интенсивностью $240 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{с}^{-1}$). Контрольная запись производилась посредством регистрации концентрации O_2 , содержащегося в измеряемой среде, и скорости его изменения. Далее суспензия, мембрана и бумага заменялись на новые, и производилась вторая запись (опыт).

Для оценки активности фотосинтеза использовалась скорость изменения концентрации O_2 , содержащегося в образце, которая определялась с временным шагом 30 с.

2.2.4. Флуоресцентный анализ изменений pH

Для оценки динамики pH в интактных проростках гороха и тыквы использовались флуоресцентные зонды FITC-dextran и BCECF_{AM}.

Для оценки pH апопласта использовался флуоресцентный зонд FITC-dextran (флуоресцеин изотиоцианат-декстран, Sigma-Aldrich, Inc., USA) (Muhling, Lauchli, 2000; Воденеев и др., 2010), который локализуется в апопласте растения благодаря наличию в его составе молекулы декстрана, представляющего собой разветвлённый полисахарид и не позволяющего зонду проходить внутрь клетки через плазматическую мембрану. Длины волн максимумов возбуждения (λ_{exmax}) и флуоресценции (λ_{emmax}) зонда FITC-dextran составляют 490 нм и 520 нм, соответственно. Для загрузки зонда лист растения (у гороха) или участок стебля (для тыквы) с частично удалённым эпидермисом инкубировали в темноте в течение 12-14 часов в растворе FITC-dextran (50 мкМ) при комнатной температуре, после чего смывали зонд с поверхности растения.

Для оценки pH цитоплазмы использовался флуоресцентный зонд BCECF_{AM} (2',7'-бис-(карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеина ацетоксиметилловый эфир, Life Technologies Corp., USA) (Dixon et al., 1989), который способен проникать через плазматическую мембрану благодаря входящему в его состав ацетоксиметилловому компоненту, компенсирующему отрицательный заряд флуорофора BCECF. При этом нейтральная молекула BCECF_{AM} свободно проходит в клетку, где внутриклеточные эстеразы отщепляют AM-компонент, высвобождая чувствительный к протонам флуорофор. Для предотвращения отщепления AM-компонента внеклеточными эстеразами загрузка зонда производилась при температуре 4°C (Zhang et al., 1998) путём инкубации листа (у гороха) или участка стебля (для тыквы) интактного растения с частично удалённым эпидермисом в темноте в течение 12-14 часов в растворе BCECF_{AM} (20 мкМ). Далее зонд отмывали путём многократной замены раствора в течение 2-3 часов. Длины волн максимумов возбуждения (λ_{exmax}) и

флуоресценции (λ_{emmax}) зонда BCECF_{AM} составляют 490 нм и 530 нм, соответственно.

Регистрация флуоресценции зондов осуществлялась с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu Corp., Japan) и специального выносного блока для твёрдых образцов «Лягушка» («Гранат», Россия) (рис. 2.4). К участку растения, загруженному зондом, подводилось оптоволокну выносного блока «Лягушка», диаметр исследуемой зоны составлял около 1 мм. Зона регистрации флуоресценции затемнялась с помощью непрозрачных стенок. Параллельно с регистрацией флуоресценции в исследуемой зоне производилась запись электрической активности.

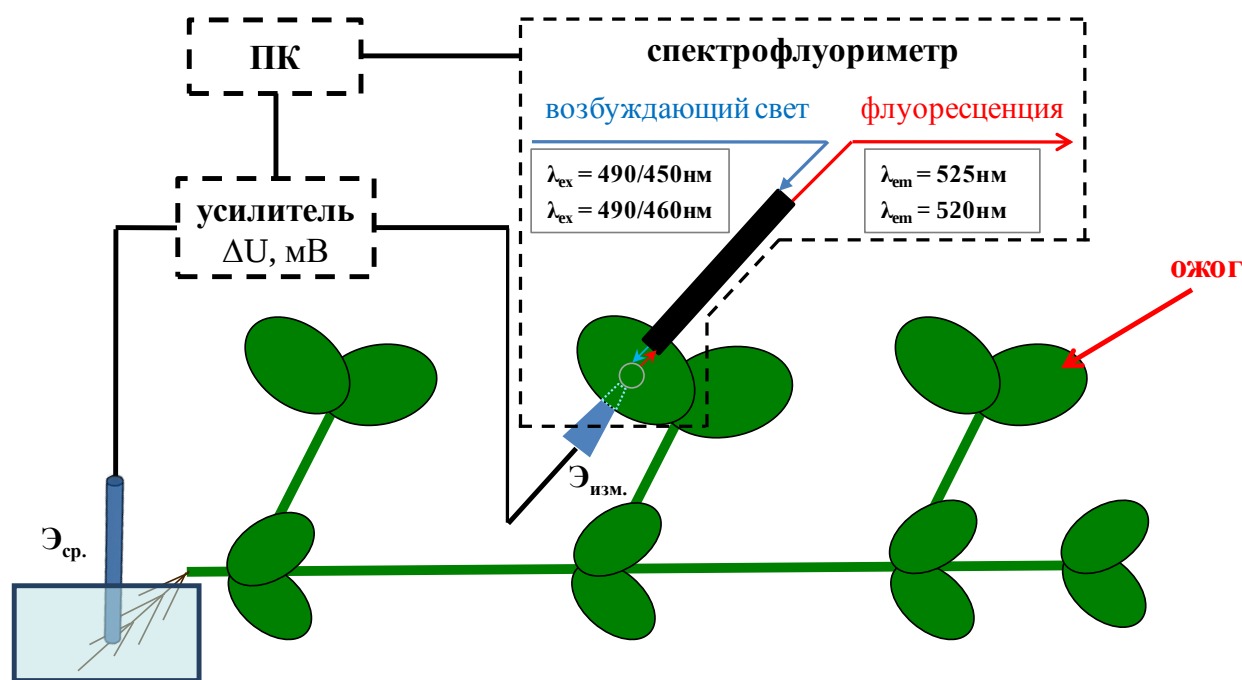


Рис. 2.4. Схема установки для регистрации электрической активности и флуоресценции у проростков гороха

Количественную оценку изменений pH апопласта производили ратиометрическим методом, для чего оценивали изменение отношения интенсивностей флуоресценции зонда FITC-dextran при его возбуждении на длинах волн 490 нм и 460 нм (I_{490}/I_{460}) (Hedrich et al., 2001); регистрация флуоресценции осуществлялась на длине волны 520 нм. Калибровка

производилась с использованием буферных растворов (Tris-MES, 20 мМ) с pH от 5,0 до 8,0 (шаг 0,5 ед.), в которые добавлялся зонд с конечной концентрацией $2 \cdot 10^{-5}$ М. При этом зависимость I_{490}/I_{460} от pH раствора для зонда FITC-dextran описывалась уравнением (1), которое использовалось далее для определения абсолютных значений pH.

$$y = 0.2757x - 0,7909 \quad (1)$$

Количественную оценку изменений внутриклеточного pH производили ратиометрическим методом, для чего оценивали изменение отношения интенсивностей флуоресценции зонда BCECF,AM при его возбуждении на длинах волн 490 нм и 450 нм (I_{490}/I_{450}) (Boens et al., 2006); регистрация флуоресценции осуществлялась на длине волны 525 нм (для проростков тыквы – 530 нм). Калибровка производилась с использованием буферных растворов (Tris-MES, 20 мМ) с pH от 5,5 до 9,0 (шаг 0,5 ед.), в которые добавлялся зонд с конечной концентрацией $2 \cdot 10^{-5}$ М. При этом зависимость I_{490}/I_{450} от pH раствора для зонда BCECF,AM описывалась уравнением (2), которое использовалось далее для определения абсолютных значений pH.

$$y = 0.5329x - 1,1007 \quad (2)$$

Количественный анализ концентрации протонов осуществлялся путём снятия спектров возбуждения периодичностью 5 секунд и последующего анализа изменений отношений I_{490}/I_{460} (FITC-dextran) и I_{490}/I_{450} (BCECF,AM).

2.2.5. Ингибиторный анализ

Для анализа влияния активности H^+ -АТФазы на индуцированный ожогом электрический и фотосинтетический ответ исследуемый лист интактного проростка гороха вымачивался в растворе специфического ингибитора H^+ -

АТФазы плазматической мембраны ортованадата натрия (Na_3VO_4 , 500 мкМ) в течение 120 мин. В другой серии экспериментов лист интактного растения вымачивался в растворе фузикоцина (1 мкМ), который повышает активность протонного насоса, в течение 120 мин (Marre, 1979; de Boer, de Vries-van Leeuwen, 2012; Camoni et al., 2013). В обоих случаях для диффузии действующего вещества в паренхиму листовой пластинки на исследуемом листе предварительно делались небольшие насечки, повреждающие эпидермис. После обработки лист растения помещался в кювету измерительного блока РАМ-флуориметра. Дальнейшие исследования параметров электрической и фотосинтетической активности проводились в соответствии со схемой, показанной на рис. 2.3.

Для анализа влияния ингибитора протонной АТФазы плазматической мембраны на световые реакции фотосинтеза суспензии протопластов гороха через 30 мин после начала записи фотосинтетических параметров в суспензию протопластов добавлялся ортованадат натрия (конечная концентрация составляла 250 мкМ). рН суспензии оценивался с помощью комбинированного электрода ЭСК-10614 и рН-метра ИПЛ-113. Общая длительность записи составляла 60 минут. При исследовании влияния ортованадата натрия на газообмен суспензии протопластов в условиях освещения полярографическим методом через 5 мин после начала записи в кювету добавлялось 30 мкл ингибитора (конечная концентрация составляла 250 мкМ) с помощью микрошприца (Hamilton, США). Для выявления влияния ортованадата натрия в анализе использовали разности динамик изменения скорости поглощения кислорода в опыте (с добавлением Na_3VO_4) и контроле (без добавления Na_3VO_4), которые рассчитывали для каждого эксперимента.

Для анализа влияния искусственного закисления цитоплазмы на фотосинтез использовалась модельная система – интактное растение, лист которого помещался в кювету РАМ-флуориметра с водным раствором, имеющим фиксированное значение рН (см. пункт 2.1.1). Через 60 мин после начала записи фотосинтетических параметров в раствор добавлялось 100 мкл стандартного раствора или Na_2CO_3 (конечная концентрация составляла 250 мкМ). Для

имитации сопровождающего ВП входа протонов в клетку через 10 минут после этого добавлялось 50 мкл протонофора КЦХФГ (Sigma-Aldrich, Inc., США), конечная концентрация которого в кювете составляла 25 мкМ. После добавления КЦХФГ регистрация фотосинтетических параметров производилась 30 минут. Параллельно осуществлялся контроль pH раствора с помощью комбинированного pH электрода и pH-метра.

При исследовании участия протонов в индукции изменений фотосинтеза использовалась модельная система – суспензия хлоропластов гороха и тыквы. Для искусственного закисления среды инкубации хлоропластов через 8 мин после начала записи параметров фотосинтеза в суспензию добавлялась 0,5 М HCl, объём которой варьировал (50, 80, 100 и 120 мкл). Для оценки влияния добавления в кювету раствора различного объёма на регистрируемые показатели за 3 мин до добавления HCl в суспензию хлоропластов добавлялось соответствующее количество среды инкубации. Регистрация параметров фотосинтеза производилась в течение 13 минут. Параллельно с записью фотосинтетических параметров регистрировался pH суспензии с помощью комбинированного pH электрода и pH-метра.

2.2.6. Математическое моделирование

Для теоретического анализа влияния переменного потенциала на фотосинтетическую активность была использована математическая модель ВП (Sukhov et al., 2013), учитывающая работу транспортных систем на плазматической мембране и буферные свойства апопласта и цитоплазмы. Для анализа влияния ВП на фотосинтез у высших растений в модели учитывались экспериментальные данные, полученные в ходе выполнения предыдущих этапов настоящего исследования. Модель анализировали численно, методом Эйлера.

2.3. Статистическая обработка результатов

Биологическая повторность экспериментов составляла 5 – 35. Для анализа результатов использовались методы вариационной статистики. Результаты представлены в виде типичных записей, средних значений и их стандартных отклонений. Достоверность различий оценивалась с использованием критерия Стьюдента.

Для корреляционного анализа связи вызванных ожогом изменений pH и фотосинтетических параметров динамики pH апопласта и цитоплазмы, ассимиляции CO₂ и NPQ были усреднены в минутном диапазоне в каждом отдельном экспериментальном повторе. Далее были найдены величины изменений исследуемых параметров при генерации ВП в каждом из экспериментальных повторов и были построены зависимости этих величин от времени. Полученные динамики усредняли по всей совокупности экспериментов и рассчитывали стандартное отклонение в каждой точке. Далее рассчитывали коэффициент корреляции между изменениями внутри- и внеклеточного pH и параметра A_{CO2} и NPQ.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛОКАЛЬНОГО ОЖОГА И ВЫЗВАННОГО ИМ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Исследование электрической активности проростков гороха показало, что ожог листа в большинстве случаев индуцировал распространяющийся электрический сигнал по типу переменного потенциала (рис. 3.1а). При этом амплитуда реакции в стебле составляла 66 ± 3 мВ, а амплитуда ВП, распространяющегося в нераздражённый лист, составляла 44 ± 6 мВ. Динамика электрической активности включала в себя начальное изменение потенциала в сторону деполяризации (3–6 мин) и последующую длительную реполяризацию. Длительность развития ВП сильно варьировала и составляла от 5 до 60 минут. Распространение вызванного ожогом листа ВП регистрировалось в 89% случаев через 1-3 минуты после раздражения. Скорость распространения ВП от электрода, находящегося на стебле ($\Theta_{\text{ст}}$), до электрода, располагающегося на нераздражённом листе ($\Theta_{\text{л}}$), составляла 0.9 ± 0.2 мм с⁻¹.

При прохождении ВП в исследуемый лист наблюдались изменения фотосинтетических параметров (рис. 3.1б). Было показано, что ВП вызывал снижение уровня ассимиляции CO₂ (A_{CO_2}). Максимальная амплитуда изменений A_{CO_2} составляла 2.52 ± 0.30 мкмоль м⁻² с⁻¹ (73% от начального уровня ассимиляции CO₂ на свету). В ответ на ВП также наблюдалось снижение активности световой стадии фотосинтеза, которое проявлялось в снижении квантовых выходов фотореакций фотосистем I ($\gamma(\text{I})$) и II ($\gamma(\text{II})$) и росте нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ). Параметры $\gamma(\text{I})$ и $\gamma(\text{II})$ снижались на 0.075 ± 0.01 и 0.086 ± 0.015 , соответственно. Амплитуда изменений NPQ составляла 0.73 ± 0.09 . Изменения фотосинтетических параметров имели сложную динамику: экстремум через 5-10 мин после начала развития электрической реакции и дальнейшие медленные изменения длительностью от 30 мин.

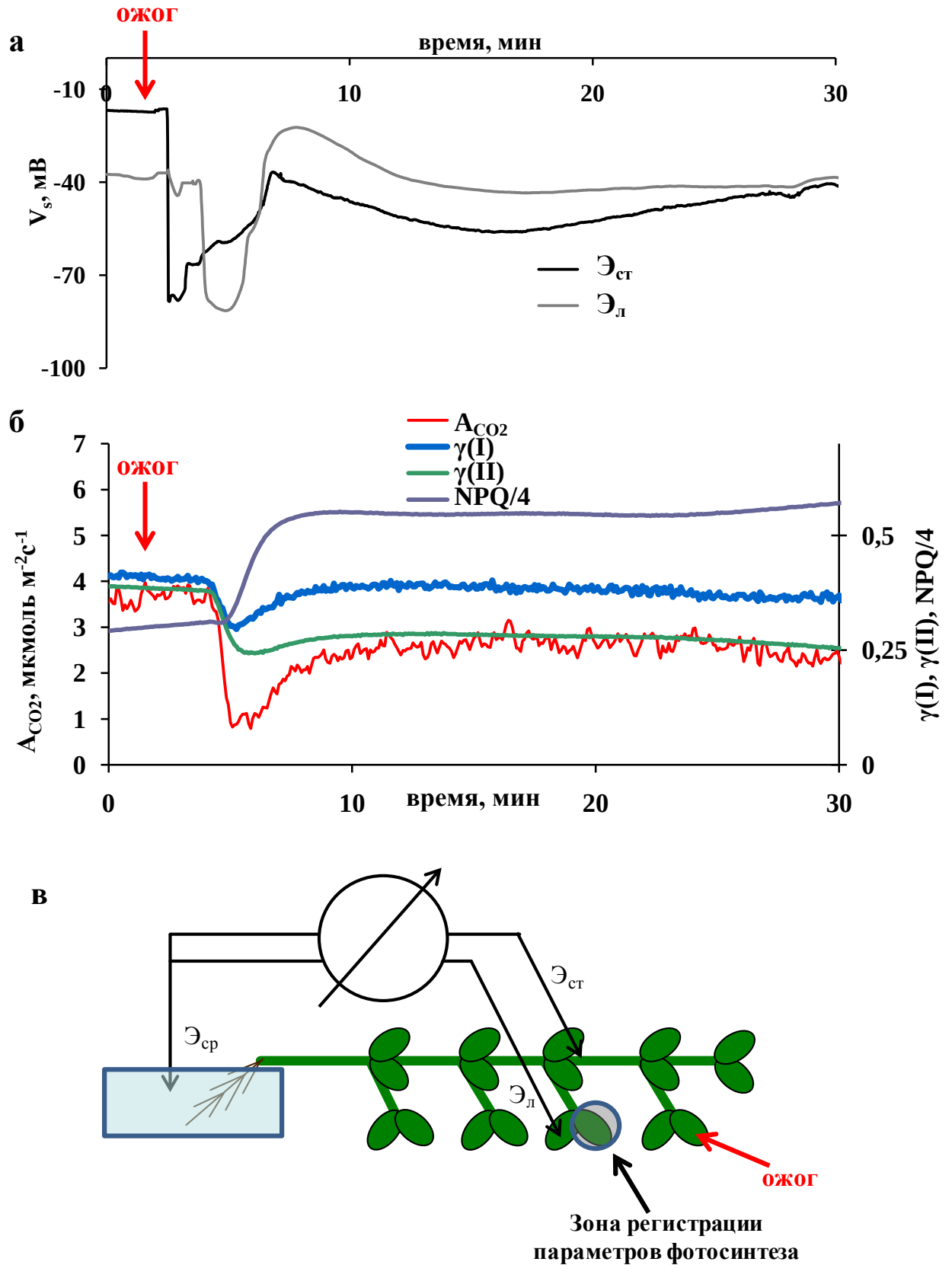


Рис. 3.1. Индуцированные ожогом изменения электрического потенциала (**а**) и параметров фотосинтеза (**б**) у гороха и схема нанесения раздражения, регистрации электрического потенциала и фотосинтетических параметров растения (**в**) ($n = 11$)

Рис. 3.1. (Окончание) $\mathcal{E}_{\text{ст}}$ – электрод, располагающийся на стебле между зоной раздражения и регистрации параметров фотосинтеза; $\mathcal{E}_{\text{л}}$ – электрод, находящийся на парном к исследуемому листе; $\mathcal{E}_{\text{ср}}$ – электрод сравнения.

Полученные результаты согласуются с данными ряда работ (Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2012, 2014;), описывающих связь электрических и фотосинтетических ответов, вызванных локальным повреждением, у разных видов растений. В частности, изменения такого характера наблюдались при генерации ВП у кукурузы (Grams et al., 2009), герани (Sukhov et al., 2012) и гороха (Sukhov et al., 2014).

В некоторых случаях (~21%) ВП возникал вблизи от зоны раздражения, однако в исследуемый лист не проходил (рис. 3.2а), при этом отсутствовали выраженные изменения фотосинтетических параметров (рис. 3.2а). Такой результат согласуется с данными работы Sukhov et al. (2012), полученными на растениях герани, и свидетельствует в пользу того, что распространение электрической реакции является обязательным условием формирования вызванной локальным повреждением быстрой инактивации фотосинтеза в нераздражённых частях растения.

При анализе связи амплитуды переменного потенциала с величинами изменений фотосинтетических параметров у проростков гороха все записи были ранжированы по возрастанию амплитуды ВП и разделены на 4 группы. Было показано (рис. 3.3), что с увеличением амплитуды ВП величина ответа нефотохимического тушения флуоресценции возрастала и достигала насыщения при больших амплитудах ВП. Также при возрастании величины электрического ответа наблюдалось усиление подавления ассимиляции CO_2 , которое несколько снижалось при ВП с большой амплитудой. Такой результат является дополнительным аргументом в пользу связи переменного потенциала и фотосинтетического ответа, вызванного повреждением.

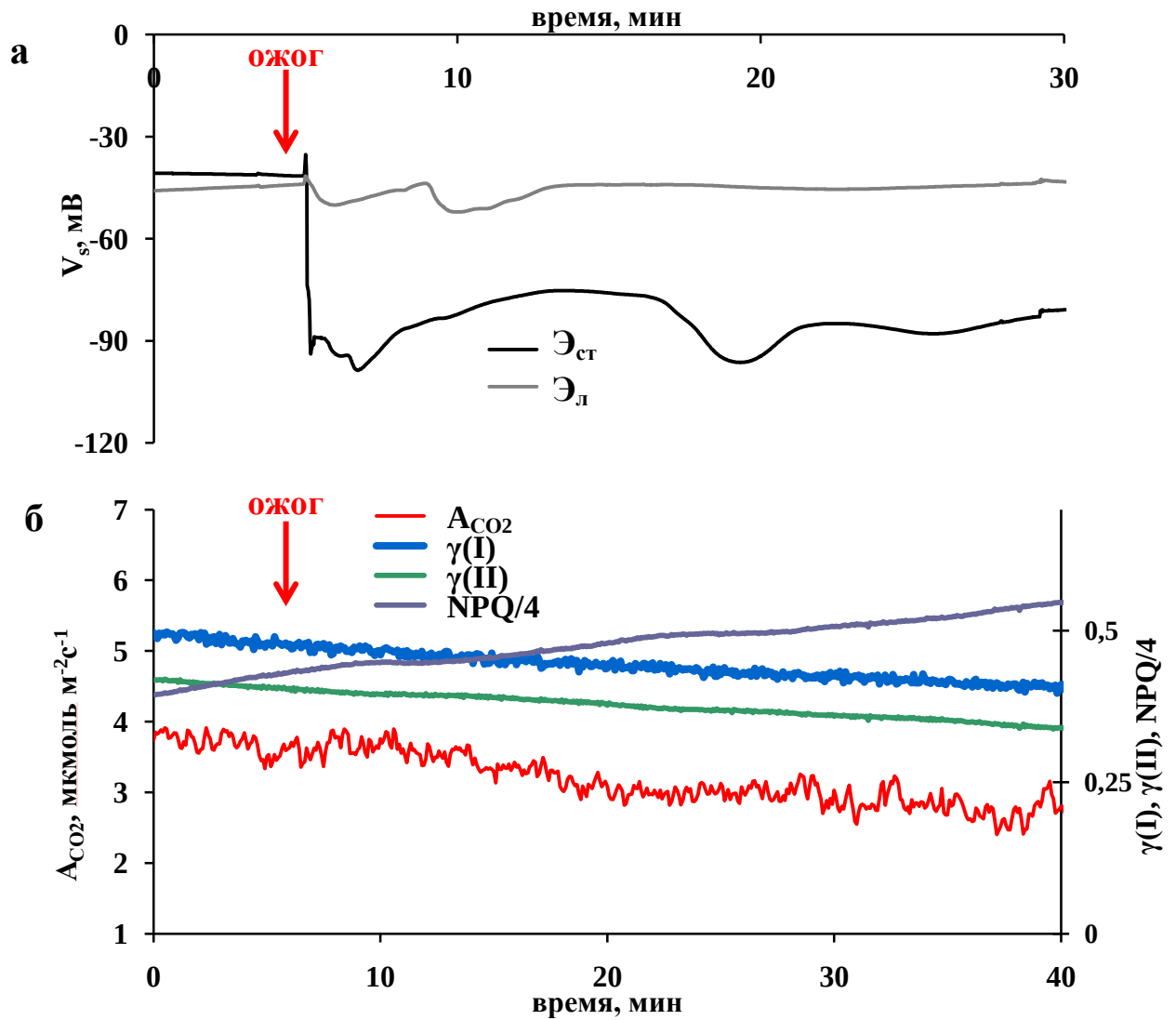


Рис. 3.2. Индуцированные ожогом изменения электрического потенциала (а) и параметров фотосинтеза (б) у гороха в случае отсутствия прохождения переменного потенциала в исследуемый лист ($n = 3$)

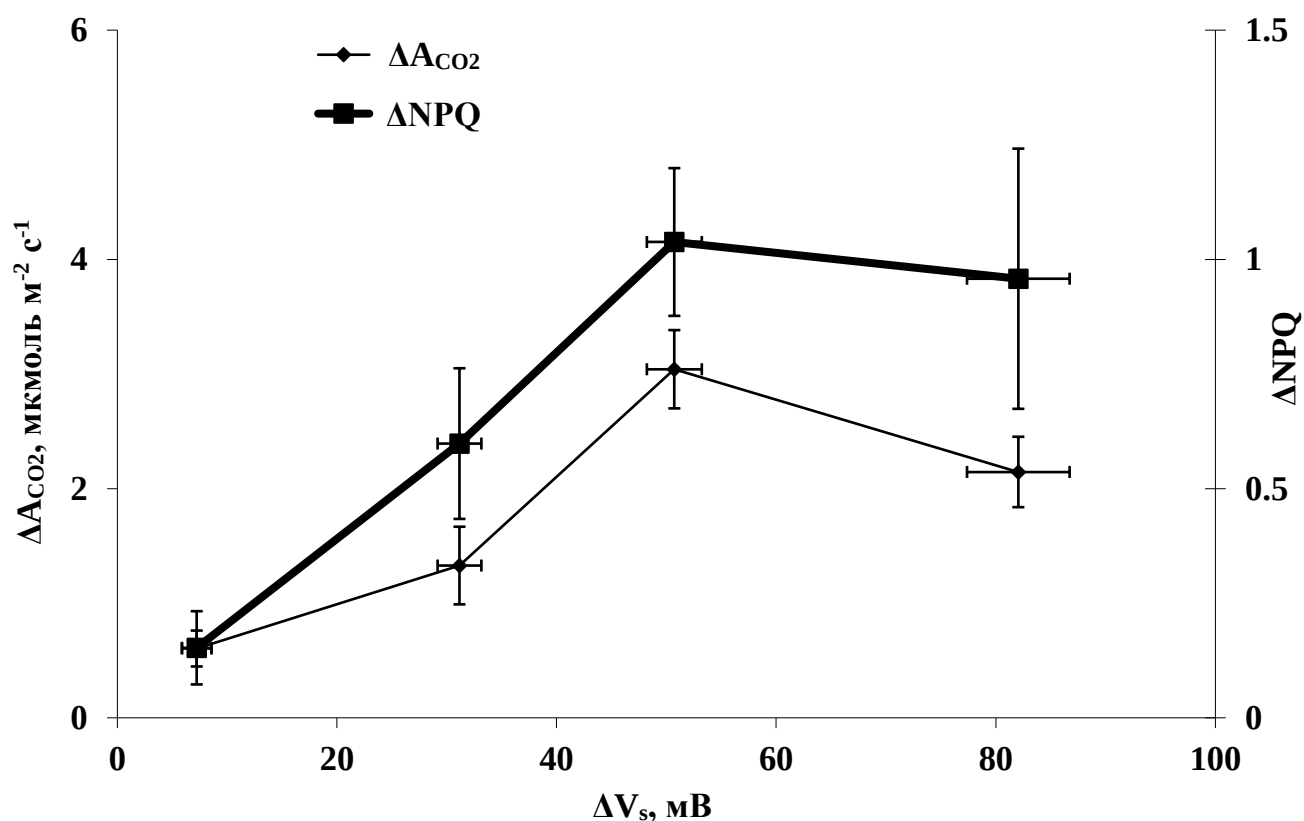


Рис. 3.3. Зависимости изменений ассимиляции CO_2 (ΔA_{CO_2}) и нефотохимического тушения флуоресценции (ΔNPQ) от амплитуды переменного потенциала (ΔV_s) ($n = 8-9$)

Влияние локального повреждения на электрическую и фотосинтетическую активность было исследовано также на растениях другого вида – проростках тыквы. Было показано, что ожог семядольного листа вызывал генерацию и распространение переменного потенциала (рис. 3.4а). Амплитуда сигнала при этом варьировала в диапазоне от 14 до 84 мВ и в среднем составляла 67 ± 4 мВ в черешке исследуемого листа и 50 ± 6 мВ в листовой пластинке, что существенно не отличалось от параметров электрических ответов на ожог в проростках гороха. Длительность фазы реполяризации составляла 20 минут и более, а скорость распространения сигнала составляла не более нескольких мм/с. Время между раздражением и началом развития ВП в исследуемом листе составляло не более 1 мин. Развитие ВП в исследуемом листе вызывало изменения фотосинтетической активности (рис. 3.4б), проявляющиеся, в частности, в длительном снижении уровня ассимиляции CO_2 .

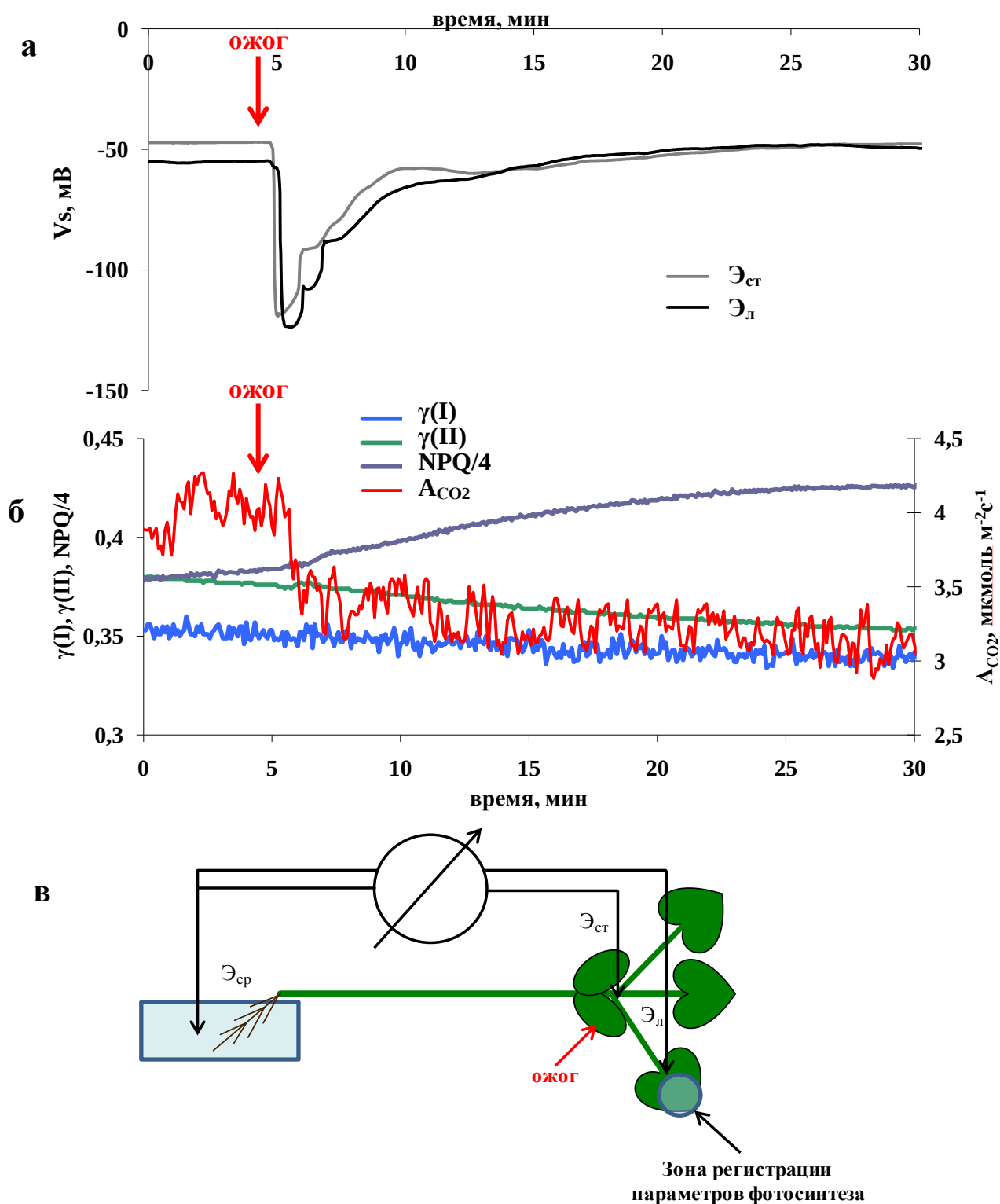


Рис. 3.4. Индуцированные ожогом изменения электрического потенциала (**а**) и параметров фотосинтеза (**б**) у тыквы и схема нанесения раздражения, регистрации электрического потенциала и фотосинтетических параметров растения (**в**) ($n = 15$)

$\mathcal{E}_{\text{ст}}$ – электрод, располагающийся на стебле между зоной раздражения и регистрации параметров фотосинтеза; $\mathcal{E}_{\text{л}}$ – электрод, находящийся на парном к исследуемому листе; $\mathcal{E}_{\text{сп}}$ – электрод сравнения.

Амплитуда ответа A_{CO_2} составляла 1.0 ± 0.2 мкмоль $m^{-2} s^{-1}$, что соответствует ~22% от начального уровня ассимиляции CO_2 на свету (4.5 ± 0.2 мкмоль $m^{-2} s^{-1}$). Изменения A_{CO_2} начинались примерно через 1 мин после начала развития ВП и достигали максимума в среднем через 12 минут после раздражения. Помимо изменений уровня ассимиляции CO_2 , генерация ВП вызывала снижение активности световой стадии фотосинтеза, которое, однако было менее выраженным, чем в проростках гороха (рис. 3.4б). В частности, наблюдалось лишь небольшое медленное повышение уровня нефотохимического тушения флуоресценции (0.16 ± 0.03). Время между началом электрической реакции и началом роста NPQ составляло в среднем чуть более 2 минут, что значительно медленнее, чем индукция ответа A_{CO_2} . Изменений квантовых выходов фотосистем I и II в большинстве случаев не наблюдалось, однако в ряде случаев (при существенном изменении уровня ассимиляции CO_2 на ~ 2 мкмоль $m^{-2} s^{-1}$ и более) было зарегистрировано небольшое снижение $\gamma(I)$ и $\gamma(II)$.

Для анализа связи между амплитудой переменного потенциала и величиной изменений ассимиляции CO_2 и нефотохимического тушения у проростков тыквы все записи были разделены на три равные группы (с низкой, средней и высокой амплитудой ВП, $n = 5$). Как видно из рис. 3.5а, величина снижения A_{CO_2} линейно зависела от амплитуды ВП, при этом наблюдалось достоверное различие между снижением A_{CO_2} в группе с низкой амплитудой ВП и в группе с высокой амплитудой. Зависимость возрастания NPQ от величины электрических изменений также хорошо описывается линейной функцией (рис. 3.5б), при этом различия между группами с низкой и высокой амплитудой ВП также были достоверными. Такая связь амплитуды изменений фотосинтетических параметров с амплитудой ВП у тыквы согласуется с данными, полученными на проростках гороха (рис. 3.3). В то же время, зависимость величины ответа A_{CO_2} и NPQ от амплитуды ВП у тыквы характеризуется отсутствием насыщения при больших величинах изменения потенциала (рис. 3.5). Такие различия могут быть обусловлены тем, что у проростков тыквы не были зарегистрированы ВП с амплитудой, при которой у гороха достигался эффект насыщения.

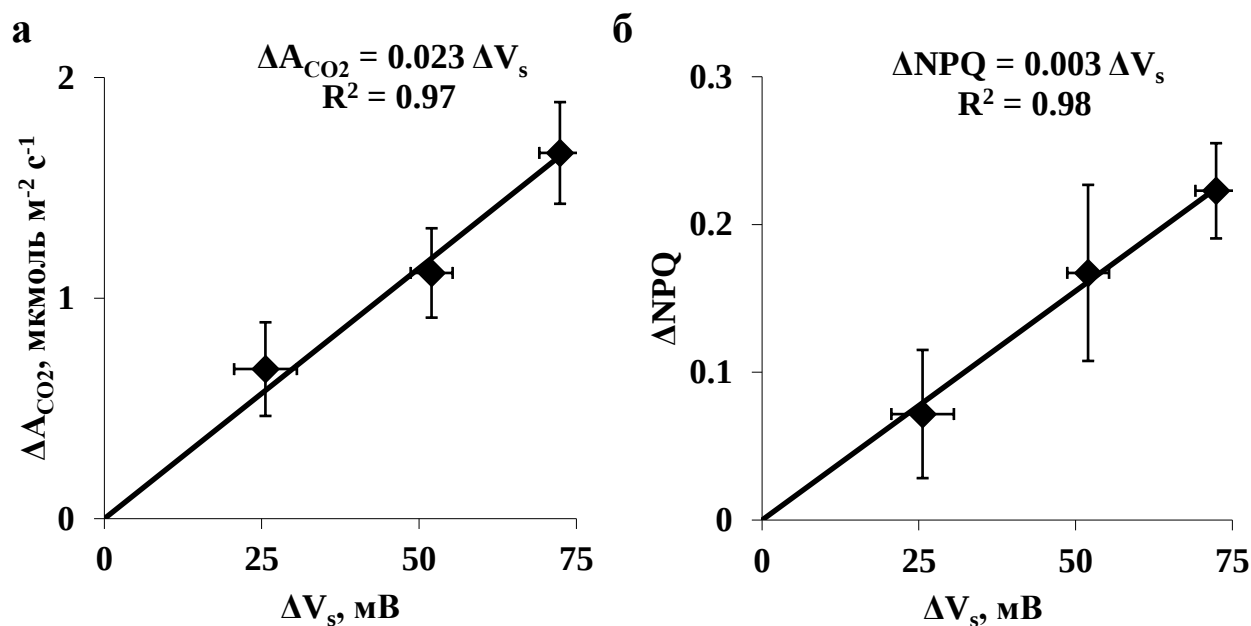


Рис. 3.5. Зависимость величины изменений уровня ассимиляции CO₂ (а) и нефотохимического тушения флуоресценции (б) от амплитуды переменного потенциала, индуцированного локальным ожогом у проростков тыквы ($n = 5$).

R^2 – коэффициент детерминации

Вопрос о ключевой роли электрических сигналов в развитии вызванных локальным повреждением фотосинтетических ответов остаётся дискуссионным. В частности, в работе Grams et al. (2009) показано, что быстрая инактивация фотосинтеза связана с распространением гидравлического сигнала по растению. С другой стороны, в отдельных работах имеются данные (Lautner et al., 2005), что подавление распространения электрического сигнала приводило к ингибированию фотосинтетического ответа. Кроме того, в работе Grams et al. (2009) показано, что фотосинтетические ответы развиваются раньше в зонах, которые расположены ближе к жилке, что, по мнению авторов, доказывает связь фотосинтетических ответов с электрическими сигналами. Наши результаты также подтверждают ключевую роль электрических сигналов в развитии вызванных локальным повреждением фотосинтетических ответов у высших растений. В пользу этого предположения свидетельствуют два аргумента: во-первых, показано, что ВП является обязательным условием развития фотосинтетического

ответа при повреждении; во-вторых, для гороха и тыквы показана положительная связь между амплитудой ВП и величиной ответа фотосинтеза, что также показывает ключевую роль ЭС. Потенциально такая связь может наблюдаться и в других случаях. В частности, некоторый фактор может вызывать одновременно электрическую и фотосинтетическую реакцию на повреждение. Однако против последнего предположения свидетельствует то, что электрический сигнал в исследуемой зоне развивается раньше, чем изменения фотосинтетической активности.

ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ H^+ -АТФАЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ВЫЗВАННОГО ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА

Протонная АТФаза плазматических мембран играет ключевую роль в функционировании клеток высших растений, создавая электрохимический градиент протонов и тем самым обеспечивая процессы трансмембранного транспорта широкого круга соединений. Кроме того, H^+ -АТФаза регулирует величину рН внутри клетки и в апопласте, создаёт и поддерживает определенную величину электрического потенциала, регулируя активность целого ряда процессов. Известно, что генерация переменного потенциала у растений сопровождается переходной и достаточно длительной инактивацией H^+ -АТФазы, что позволяет предположить её участие в развитии вызванного ВП фотосинтетического ответа.

Для проверки этого предположения был проведён анализ параметров переменного потенциала и фотосинтетического ответа на него на фоне пониженной и повышенной активности протонной АТФазы, для чего лист растения вымачивался в растворе ортованадата натрия или фузикокцина, соответственно. На рис. 4.1 показано, что предварительная обработка специфическим ингибитором протонной АТФазы плазматической мембраны ортованадатом натрия вызывала тенденцию к снижению амплитуды переменного потенциала (с $45,7 \pm 8,7$ мВ до $18,8 \pm 4,8$ мВ). Такой результат согласуется с литературными данными (Katicheva et al., 2014) и подтверждает роль протонной АТФазы плазматической мембраны в развитии переменного потенциала. При анализе влияния обработки ортованадатом натрия на вызванный ВП фотосинтетический ответ было показано достоверное снижение величин ответов световой и темновой стадий фотосинтеза (рис. 4.2). Так, амплитуда изменений уровня ассимиляции CO_2 после предварительной обработки ингибитором составляла $1,015 \pm 0,20$ по сравнению с $1,90 \pm 0,08$ в контроле. Кроме того, предобработка ортованадатом снижала величину ответа квантовых

выходов фотосистем I и II (с 0.055 ± 0.008 до 0.024 ± 0.006 для $\gamma(I)$ и с 0.065 ± 0.006 до 0.029 ± 0.007 для $\gamma(II)$), а также уменьшала амплитуду возрастания нефотохимического тушения (с 0.66 ± 0.07 в контроле до 0.33 ± 0.14 после обработки ингибитором).

При обработке активатором H^+ -АТФазы фузикокином не было обнаружено достоверных отличий параметров переменного потенциала в сравнении с контролем (рис. 4.2). При анализе влияния фузикокина на вызванные ВП фотосинтетические ответы было выявлено достоверное увеличение ответа ассимиляции CO_2 , также наблюдалась тенденция к возрастанию амплитуды изменений NPQ. В то же время, другие фотосинтетические показатели не менялись.

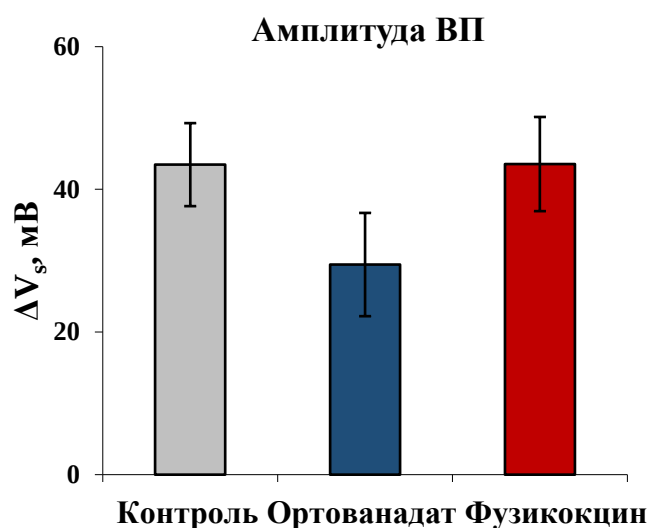


Рис. 4.1. Средние изменения поверхностного потенциала, вызванные локальным ожогом, в контроле ($n = 8$) и после предварительной обработки ортованадатом натрия (500 мкМ) ($n = 8$) и фузикокином (1 мкМ) ($n = 7$)

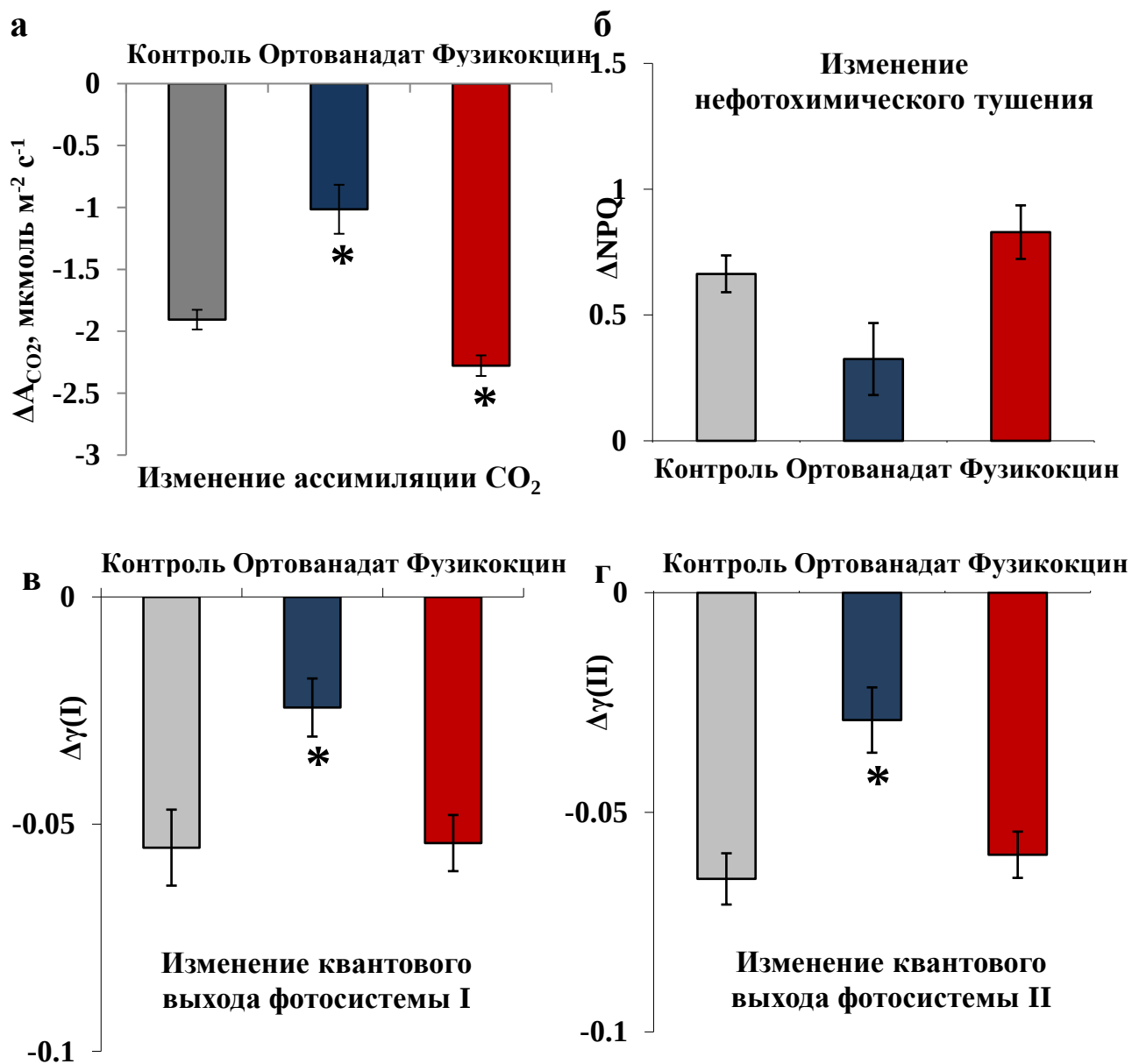


Рис. 4.2. Средние изменения уровня ассимиляции CO_2 (**а**), нефотохимического тушения флуоресценции (**б**) и квантовых выходов фотореакций фотосистем I (**в**) и II (**г**), вызванные локальным ожогом, в контроле ($n = 8$) и после предварительной обработки ортованадатом натрия (500 мкМ) ($n = 8$) и фузикокоцином (1 мкМ) ($n = 7$)

Полученные результаты показывают, что H^+ -АТФаза играет важную роль при развитии фотосинтетического ответа. При увеличении активности протонной АТФазы наблюдается более выраженный ответ, в то время как снижение её активности вызывает существенное подавление изменений параметров фотосинтеза при ВП. Можно предположить, что именно инактивация H^+ -АТФазы

плазматической мембраны, которой сопровождается развитие ВП (Davies, 2006; Stahlberg et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Vodeneev et al., 2015), играет ключевую роль в преобразовании ВП в фотосинтетический ответ.

Для проверки этого предположения было проведено исследование динамики параметров световой стадии фотосинтеза и газообмена при добавлении ингибитора H^+ -АТФазы ортованадата натрия на модельной системе – суспензии изолированных протопластов гороха. Было показано, что добавление ингибитора в суспензию вызывало снижение скорости выделения кислорода на свету (рис. 4.3а), что отражает снижение активности фотосинтетических процессов. Важно отметить, что изменение концентрации кислорода в суспензии может быть частично связано с изменением активности дыхания, однако изменения, связанные с дыханием (рис. 4.3б), почти в два раза ниже, чем таковые в условиях освещения (рис. 4.3а), что говорит о существенном вкладе инактивации фотосинтеза в изменение кислородного обмена.

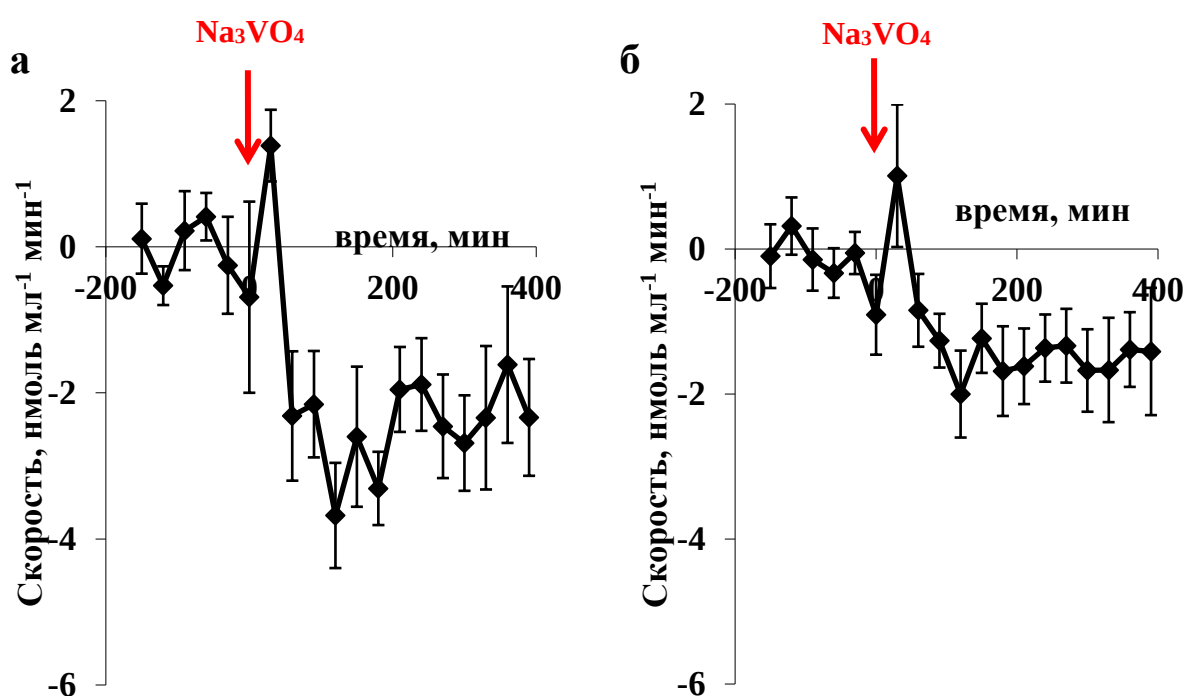


Рис. 4.3. Средние изменения поглощения кислорода на свету (а) ($n = 6$) и в условиях отсутствия освещения (б) ($n = 7$) при добавлении ортованадата натрия в суспензию изолированных протопластов гороха. Стрелкой обозначен момент добавления ортованадата натрия (конечная концентрация – 250 мкМ)

Исследование ответа параметров световой стадии фотосинтеза показало, что в ответ на добавление ортованадата натрия происходил рост нефотохимического тушения флуоресценции и снижение квантовых выходов фотореакций фотосистем I и II (рис. 4.4), при этом динамика изменений $\gamma(I)$, $\gamma(II)$ и NPQ сходна с динамикой индуцированных ВП изменений этих параметров (рис. 3.1).

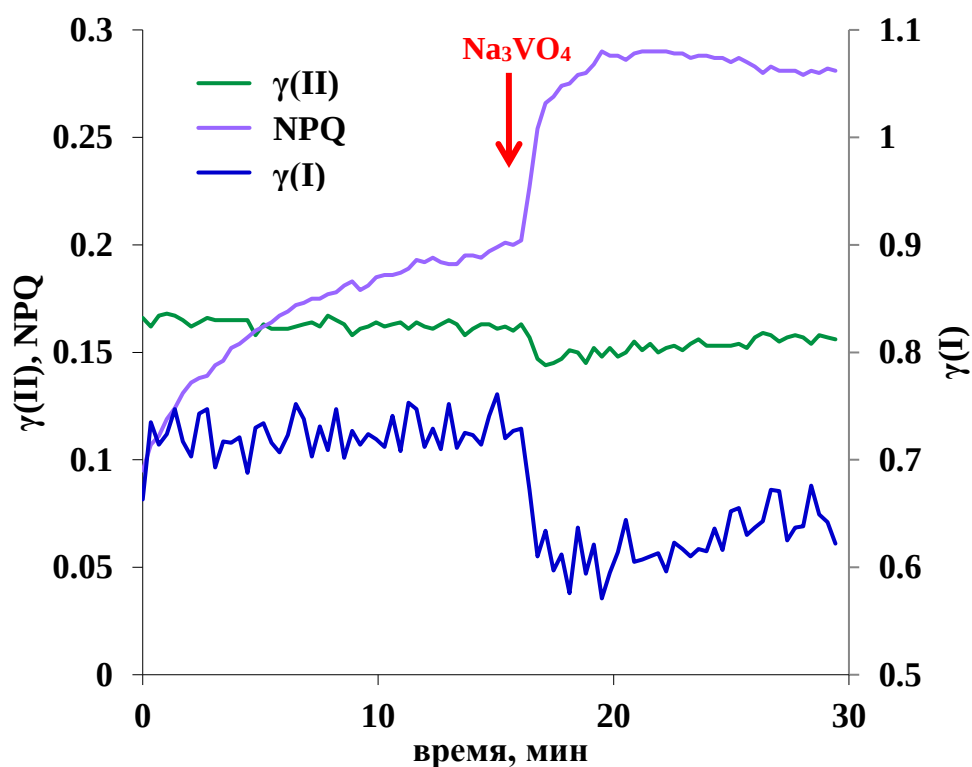


Рис. 4.4. Изменение параметров световой стадии фотосинтеза при добавлении ортованадата натрия в суспензию изолированных протопластов гороха ($n = 7$). Стрелкой обозначен момент добавления ортованадата натрия (конечная концентрация – 250 мкМ)

Показанная роль протонной АТФазы в развитии ответа фотосинтеза делает актуальным вопрос, каким образом данная инактивация может вызывать развитие ответа фотосинтеза. Изменения рН цитоплазмы и апопласта являются весьма вероятным механизмом развития такого ответа. В частности, в отдельных работах показано, что генерация ВП сопровождается закислением цитоплазмы (Grams et al., 2009) и защелачиванием апопласта (Grams et al., 2009; Zimmermann, Felle,

2009; Воденеев и др., 2011). Кроме того, показано, что зависимость световой стадии фотосинтеза от pH имеет сложный характер (Grams et al., 2009), и существуют диапазоны, в которых снижение pH окружающей хлоропласты среды может приводить к некоторому уменьшению квантового выхода фотосистемы II. Поэтому следующим этапом исследования стал анализ связи развития переменного потенциала с изменениями pH.

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ РОЛИ СДВИГОВ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНОГО рН В РАЗВИТИИ ВЫЗВАННОГО ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА

5.1. Анализ динамики внутри- и внеклеточной концентрации ионов H^+ при развитии переменного потенциала

Количественная оценка рН цитоплазмы и апопласта осуществлялась с помощью ратиометрического анализа, который позволяет определять абсолютные величины рН, не учитывая количество зонда, загрузившегося в растение.

Для определения рН апопласта использовался рН-чувствительный флуоресцентный зонд FITC-dextran. Было показано, что рН апопласта в покое составлял 5.7 ± 0.1 (рис. 5.1в). Ожог соседнего листа вызывал генерацию и распространение в исследуемый лист переменного потенциала, амплитуда которого составляла 44 ± 8 мВ. Генерация переменного потенциала в исследуемом листе сопровождалась обратимым возрастанием рН апопласта (рис. 5.1а). Сдвиг рН составлял 0.22 ± 0.02 ед. (рис. 5.1г), при этом величина изменений рН варьировала от 0.16 до 0.30 ед. рН. Длительность изменений рН апопласта составляла около 10 минут.

Определённая с помощью флуоресцентного зонда BCECF,АМ, способного проникать через мембрану, величина рН цитоплазмы составляла 7.1 ± 0.2 ед. (рис. 5.1в). Локальный ожог вызывал генерацию и распространение ВП в исследуемый лист; амплитуда ВП при этом составляла 57 ± 4 мВ. Развитие ВП в исследуемом листе сопровождалось обратимым снижением рН цитоплазмы на 0.30 ± 0.05 (рис. 5.1б, г), при этом амплитуда изменений рН цитоплазмы варьировала от 0.18 до 0.6 ед. Изменения рН цитоплазмы наблюдались в среднем в течение 20 минут после ожога.

Была показана высокая корреляция между амплитудой ВП в исследуемых листьях и величиной снижения рН цитоплазмы ($r = 0.80$, $p < 0.05$). Коэффициент

корреляции между амплитудой ВП и амплитудой изменения рН апопласта составлял 0.61 ($p > 0.05$).

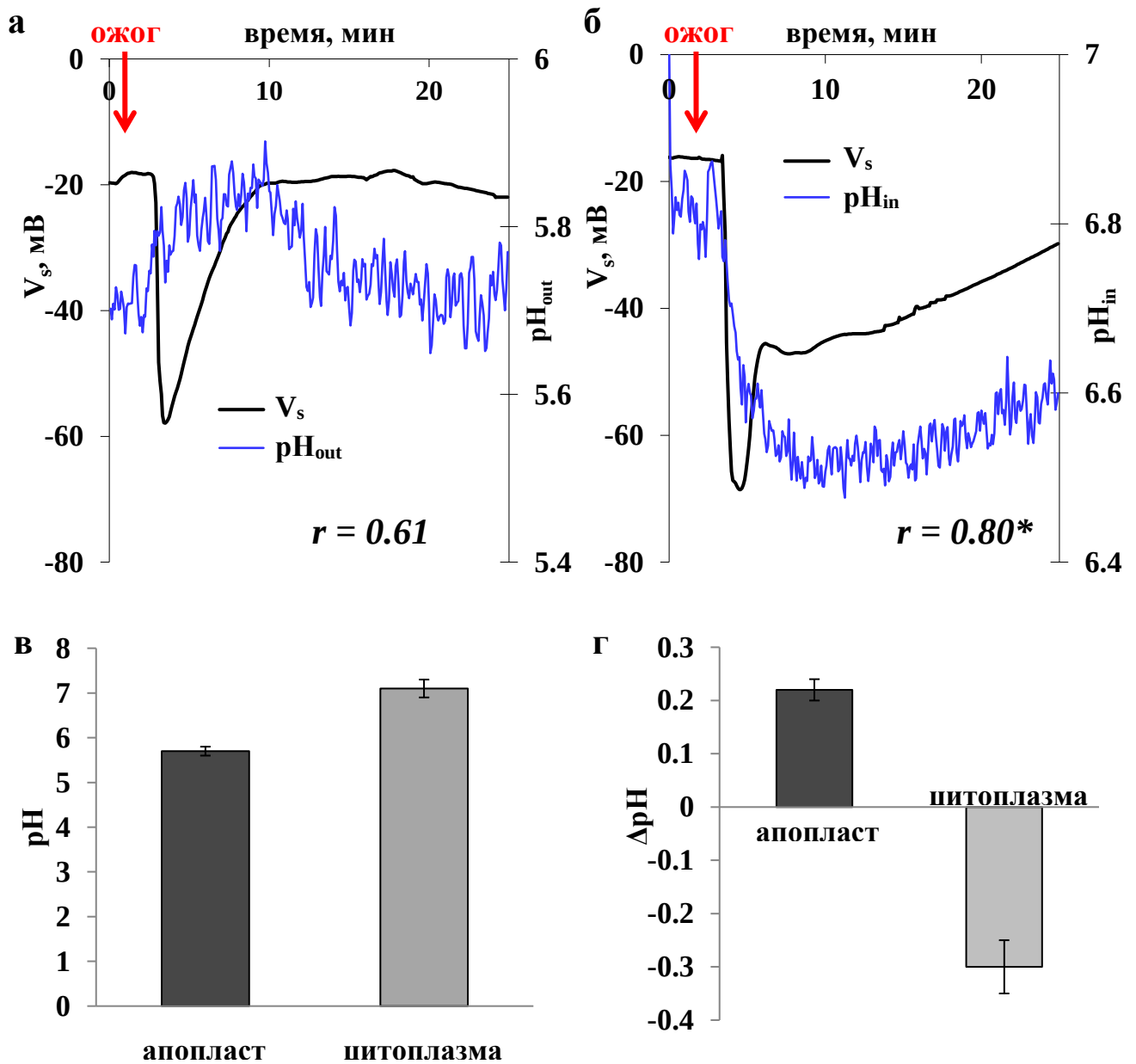


Рис. 5.1. Индуцированные локальным ожогом изменения электрического потенциала и рН апопласта **(а)** (FITC-dextran, 50мкМ) ($n=9$) и цитоплазмы **(б)** (BCECF, АМ, 20мкМ) ($n=8$) в листе гороха, а также средние значения рН апопласта и цитоплазмы в покое **(в)** и изменений рН (ΔpH) при генерации ВП у проростков гороха **(г)**. Красной стрелкой обозначен момент ожога. Раздражение наносилось на расстоянии 10 см от зоны регистрации электрической активности и флуоресценции. * - $p < 0.05$.

Количественный анализ рН апопласта и цитоплазмы у тыквы, проведённый с использованием описанной выше методики, показал сходные результаты (рис. 5.2).

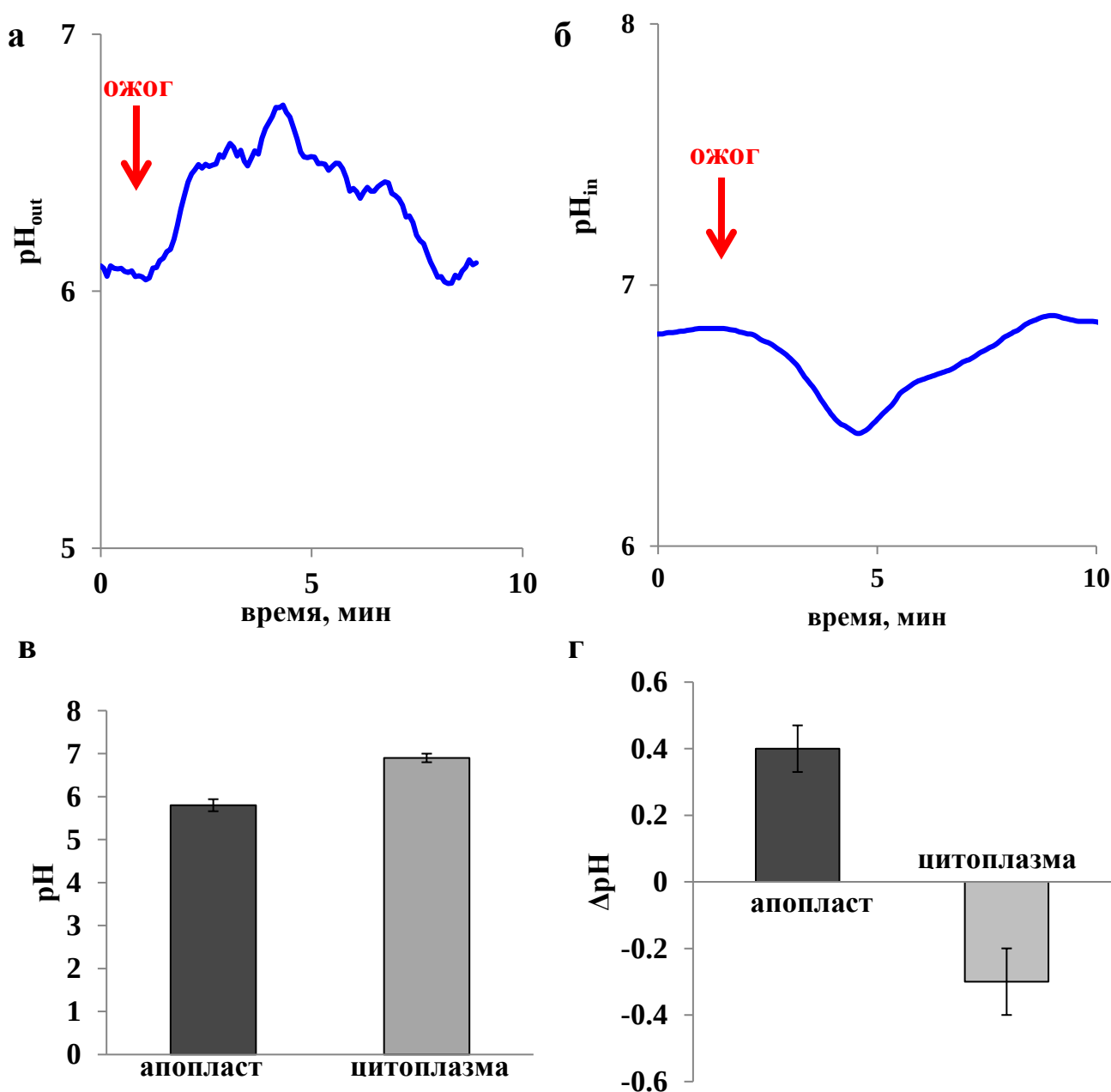


Рис. 5.2. Изменения рН апопласта (а) (FITC-dextran, 50мкМ) ($n = 8$) и цитоплазмы (б) (BCECF,AM, 20мкМ) ($n = 12$), а также средние значения рН апопласта и цитоплазмы в покое (в) и изменений данных параметров при генерации ВП (г) в гипокотиле проростков тыквы. Красной стрелкой обозначен момент ожога. Раздражение наносилось на расстоянии 10 см от зоны регистрации электрической активности и флуоресценции.

Так, рН апопласта в гипокотиле проростков тыквы в покое составлял 5.8 ± 0.14 ед. (рис. 5.2в), при этом значение его сильно варьировало. При прохождении ВП в исследуемую зону наблюдалось обратимое защелачивание апопласта (рис. 5.2а), максимальное возрастание рН при этом составляло 0.40 ± 0.07 (рис. 5.2г). Общая длительность увеличения рН апопласта варьировала, составляя, в среднем, 8 мин.

Значение рН цитоплазмы в покое составляло 6.90 ± 0.10 (рис. 5.2в), а развитие ВП в исследуемой зоне вызывало закисление цитоплазмы (рис. 5.2б) на 0.30 ± 0.10 ед. рН (рис. 5.2г). Общая длительность изменений рН цитоплазмы составляла в среднем 8 мин.

Такой характер изменений рН, вероятно, связан с механизмом генерации переменного потенциала, ключевым этапом которой является обратимая инактивация H^+ -АТФазы (Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2015), что обеспечивает суммарный вход ионов H^+ из апопласта в клетку. Зарегистрированные величины сдвигов внутри- и внеклеточного рН соответствуют литературным данным, полученным на проростках кукурузы (Grams et al., 2009), ячменя (Zimmermann, Felle, 2009) и тыквы (Воденеев и др., 2011). Такие изменения рН способны выполнять сигнальную функцию, индуцируя развитие ответа растения на стресс (изменение интенсивности освещения, засоление и изменение влажности почв, аноксии и др.), вызывая изменения активности работы ферментов, влияя на интенсивность роста клеток растяжением, тургорное давление в клетках, транспортные процессы на мембранах (Felle, 2001; Тарчевский, 2002) и др. В том числе, сдвиги внутри- и внеклеточной концентрации протонов могут играть ключевую роль в формировании вызванных ВП физиологических изменений у высших растений, в частности, изменений фотосинтетической активности. Так, в работе Grams с соавт. (2009) показана зависимость величины квантового выхода фотосистемы II от рН среды инкубации изолированных хлоропластов кукурузы. При этом снижение рН окружающей хлоропласты среды сопровождается изменениями

фотосинтетической активности как в изолированных хлоропластах, так и в интактных растениях.

5.2. Оценка влияния сдвига внутриклеточного pH на параметры фотосинтеза на модельных системах различного уровня

Для имитации сопровождающего развитие ВП входа ионов H^+ в клетку использовалась модельная система – лист интактного растения, погружённый в водный раствор (Глава 2), значение pH которого ($pH=6.0$) было близко к зарегистрированному у проростков гороха значению pH апопласта ($pH=5.7\pm0.1$) и значительно ниже величины внутриклеточного pH ($pH=7.1\pm0.2$). Для индукции входа протонов в раствор, омывающий исследуемый лист, добавлялся протонофор КЦХФГ (конечная концентрация в растворе составляла 25 мкМ). Было показано, что добавление КЦХФГ индуцировало снижение $\gamma(I)$ на 0.049 ± 0.006 и $\gamma(II)$ на 0.058 ± 0.007 и рост NPQ (рис. 5.3а). Вследствие того, что содержание углекислого газа в водном растворе незначительно по сравнению с концентрацией CO_2 в воздухе, что существенно подавляет работу цикла Кальвина, в отдельной серии экспериментов перед добавлением протонофора в раствор добавлялся $NaHCO_3$ (250 мкМ), что вызывало повышение $\gamma(II)$ и снижение NPQ и слабо влияло на $\gamma(I)$ (рис. 5.3б). В таких условиях добавление КЦХФГ вызывало более выраженный фотосинтетический ответ, чем ответ без предварительной добавки $NaHCO_3$. В частности, амплитуда снижения $\gamma(I)$ и $\gamma(II)$ составляла 0.081 ± 0.005 и 0.084 ± 0.005 , соответственно. С другой стороны, значимых различий между ростом NPQ без добавки $NaHCO_3$ и после его добавления не наблюдалось. Стоит отметить, что добавление $NaHCO_3$ и КЦХФГ не вызывало изменений pH раствора, омывающего исследуемый лист (данные не приведены). Кроме того, добавление стандартного раствора в объёме, равном объёму добавляемого $NaHCO_3$, не влияло на параметры фотосинтеза (рис. 5.3а).

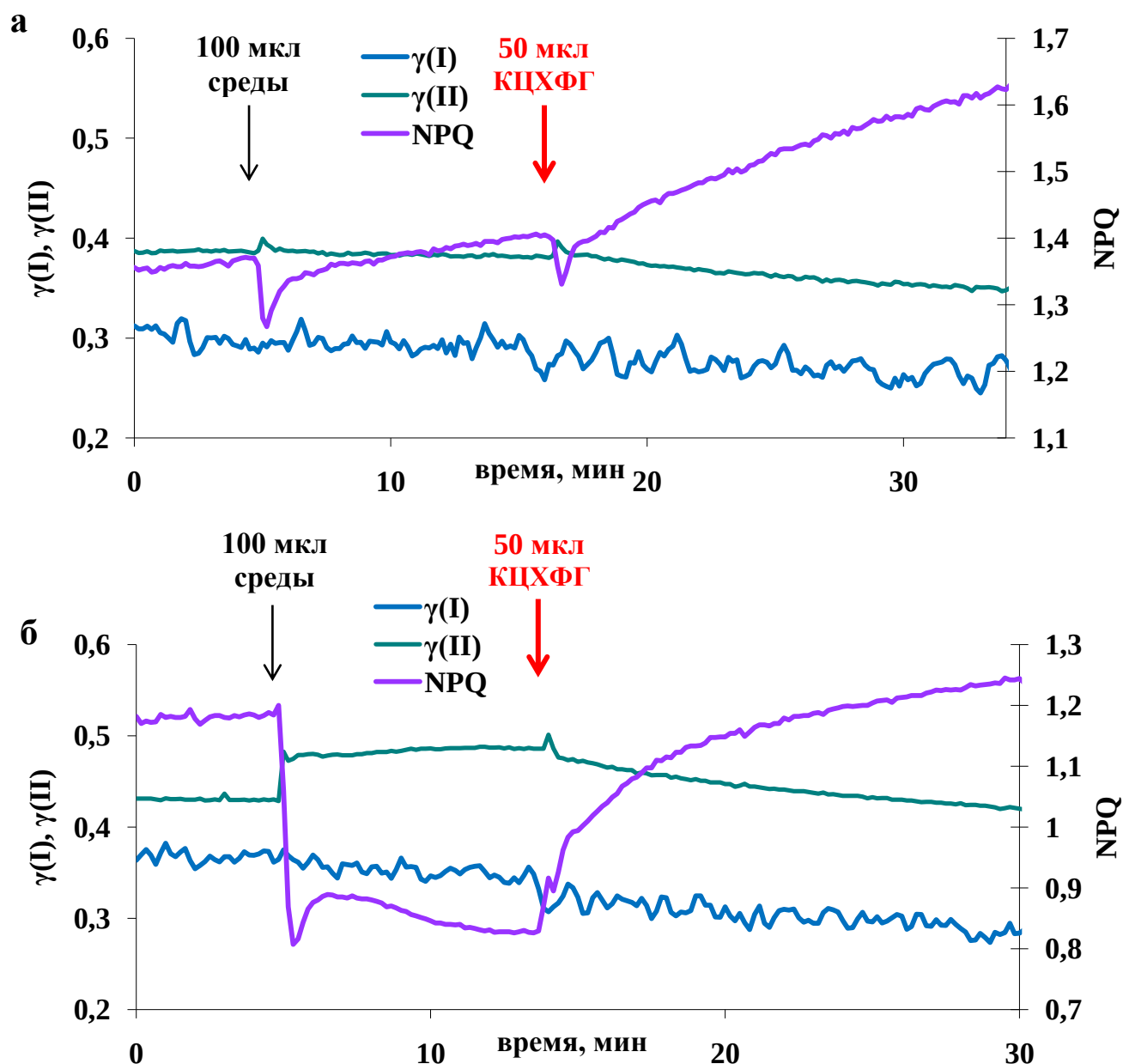


Рис. 5.3. Примеры записи изменений параметров фотосинтеза в ответ на добавление протонофора КЦХФГ в раствор, омывающий лист интактного растения, pH=6

(а) без предварительной добавки NaHCO_3 ($n=11$) и **(б)** с предварительной добавкой NaHCO_3 (итоговая концентрация 250 μM , $n=8$)

Наблюдаемый фотосинтетический ответ на добавление протонофора сходен с индуцированным ВП фотосинтетическим ответом в интактных проростках гороха (рис. 3.1а). Более того, амплитуды снижения $\gamma(I)$ и $\gamma(II)$ были больше при высокой концентрации CO_2 (250 μM NaHCO_3), чем при низкой (без NaHCO_3), в

то время как амплитуда возрастания NPQ не зависела от концентрации CO₂ (рис. 5.3). Такой характер изменений сходен с фотосинтетическими ответами, вызванными ВП, в условиях низкого содержания внешнего CO₂ у герани (Sukhov et al., 2012) и гороха (Sukhov et al., 2014).

Эксперименты с добавлением протонофора показали влияние входа протонов на фотосинтез. Для количественного анализа влияния изменений pH на фотосинтез использовалась другая модельная система – суспензия хлоропластов гороха. Небольшое снижение pH среды инкубации (с 6.9 до 6.8) слабо влияло на параметры фотосинтеза (рис. 5.4б, г). В то же время, сильный сдвиг pH (с 6.9 до 6.1) индуцировал существенное снижение $\gamma(I)$ и $\gamma(II)$ и рост NPQ (рис. 5.4а,в). Чтобы оценить влияние добавления на фотосинтетические параметры, перед добавлением кислоты в суспензию добавлялось 120 мкл среды инкубации. В ответ на добавление среды развития фотосинтетического ответа не наблюдалось, однако наблюдался артефакт, связанный с добавлением, у $\gamma(I)$, а также кратковременное снижение NPQ, что не принималось во внимание при дальнейшем анализе. Зависимость величины изменений различных фотосинтетических параметров от величины pH в исследованном диапазоне неодинакова. В частности, увеличение NPQ наблюдалось в диапазоне значений pH с 6.88 до 6.78 ед. и ниже (рис. 5.5), а уменьшение $\gamma(I)$ и $\gamma(II)$, индуцированное снижением pH, происходило в том случае, если pH менялся с 6.88 до 6.38 ед. pH и ниже. Зависимости амплитуды изменений этих параметров от внешнего pH несколько различались. Амплитуда снижения $\gamma(I)$ росла сильнее в диапазоне от 6.78 до 6.22 ед. pH и не менялась при pH < 6.22. Амплитуда снижения $\gamma(II)$ также возрастала в диапазоне от 6.88 до 6.38 ед. и не менялась при pH < 6.38. Амплитуда возрастания NPQ росла во всём исследуемом диапазоне pH (от 6.88 до 6.11 ед. pH).

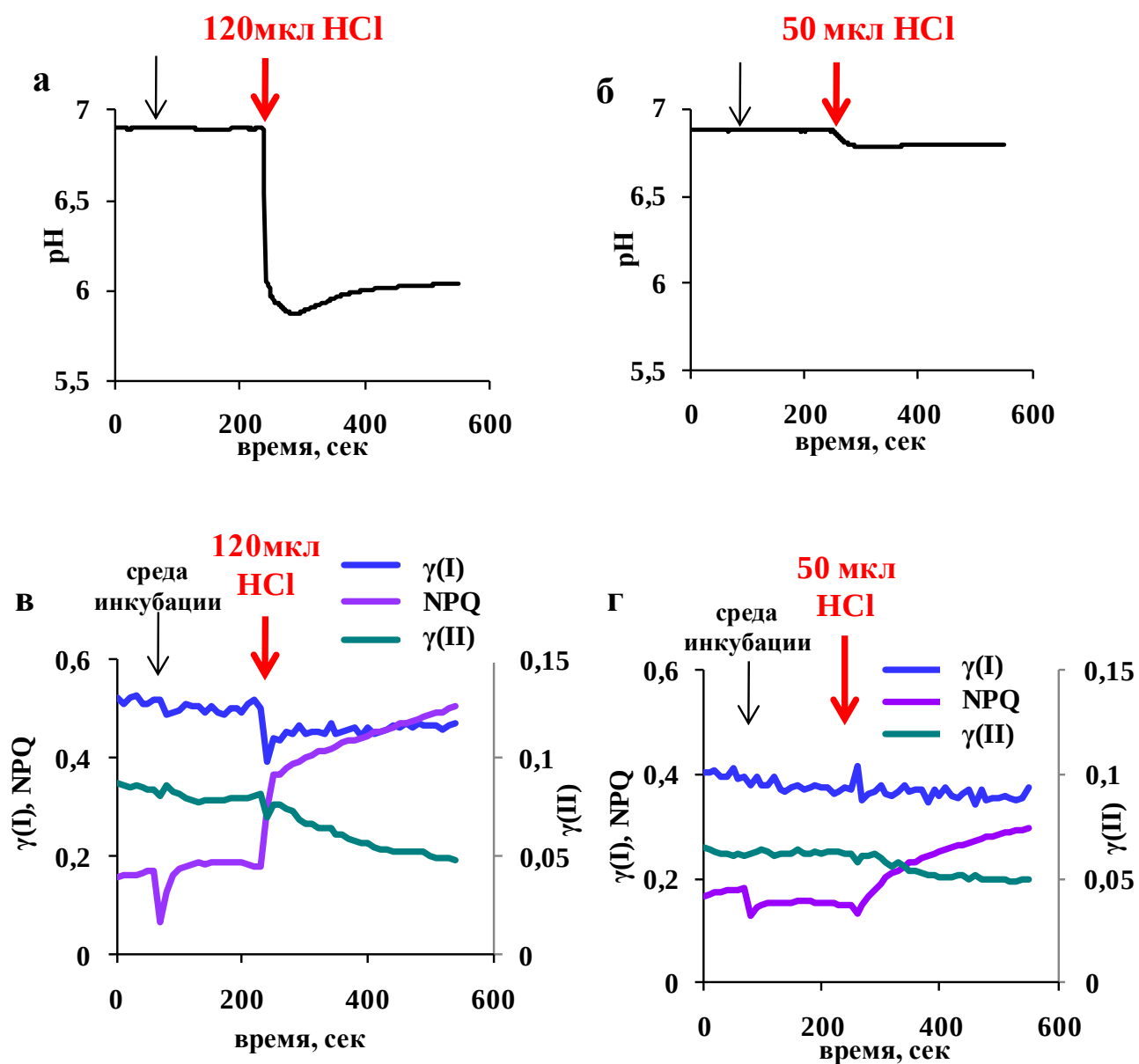


Рис. 5.4. Динамика изменений квантовых выходов фотосистем I и II и нефотохимического тушения флуоресценции (в, г) хлоропластов при снижении pH омывающего их раствора (а, б) ($n = 5-7$)

Чёрная стрелка обозначает момент добавления среды инкубации, красная стрелка — момент добавления HCl.

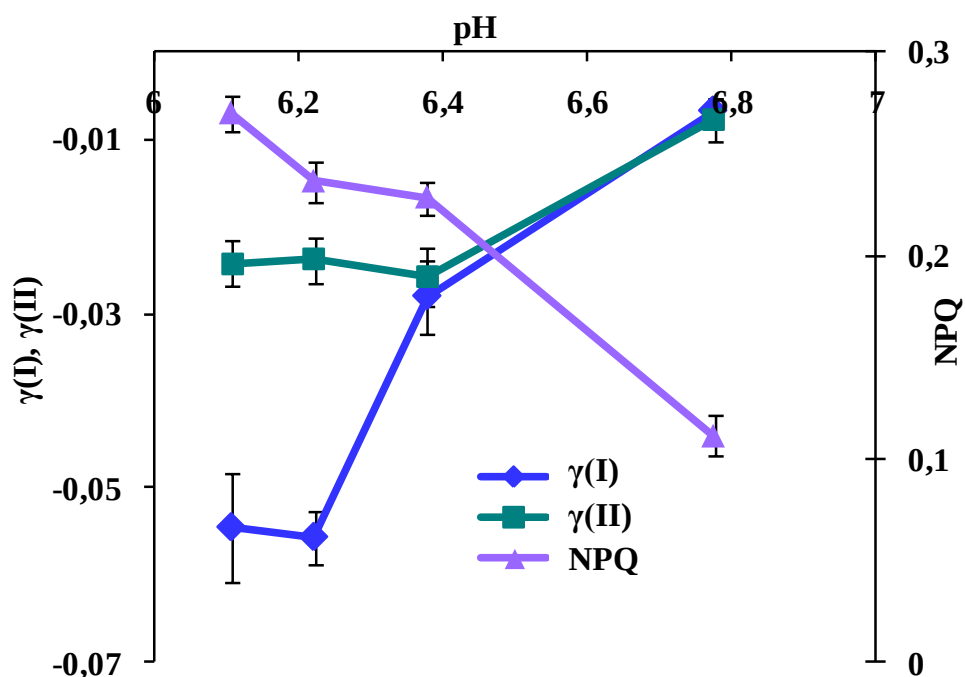


Рис. 5.5. Зависимость изменений фотосинтетических параметров (средние значения) от конечного значения pH среды инкубации при добавлении кислоты ($n=5-7$)

Эксперименты на изолированных хлоропластах показали, что снижение pH среды инкубации, имитирующее закисление цитоплазмы при ВП, индуцирует фотосинтетический ответ (рис. 5.4). Данные результаты согласуются с результатами более ранних исследований, показывающими влияние закисления среды инкубации на квантовый выход фотосистемы II хлоропластов кукурузы (Grams et al., 2009). Зарегистрированные в настоящем исследовании изменения параметров световой стадии фотосинтеза наблюдались при величине сдвига pH в диапазоне от 0.1 до 0.7 ед. (рис. 5.5). Такие значения соответствуют амплитуде изменений pH цитоплазмы при генерации ВП в интактных проростках гороха, которая варьировала в диапазоне 0.16–0.60 ед. pH. С другой стороны, различия в зависимостях параметров световой стадии фотосинтеза от pH могут свидетельствовать о существовании различных механизмов развития фотосинтетического ответа, что согласуется с рядом литературных данных (Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012).

Эксперименты на изолированных хлоропластах тыквы также показали влияние сдвига рН на фотосинтез. На рис. 5.6 показано, что закисление среды инкубации при добавлении в суспензию соляной кислоты вызывало достаточно выраженный рост нефотохимического тушения флуоресценции (рис. 5.6а, б), причём величина его изменений линейно зависела от величины сдвига рН (рис. 5.6в).

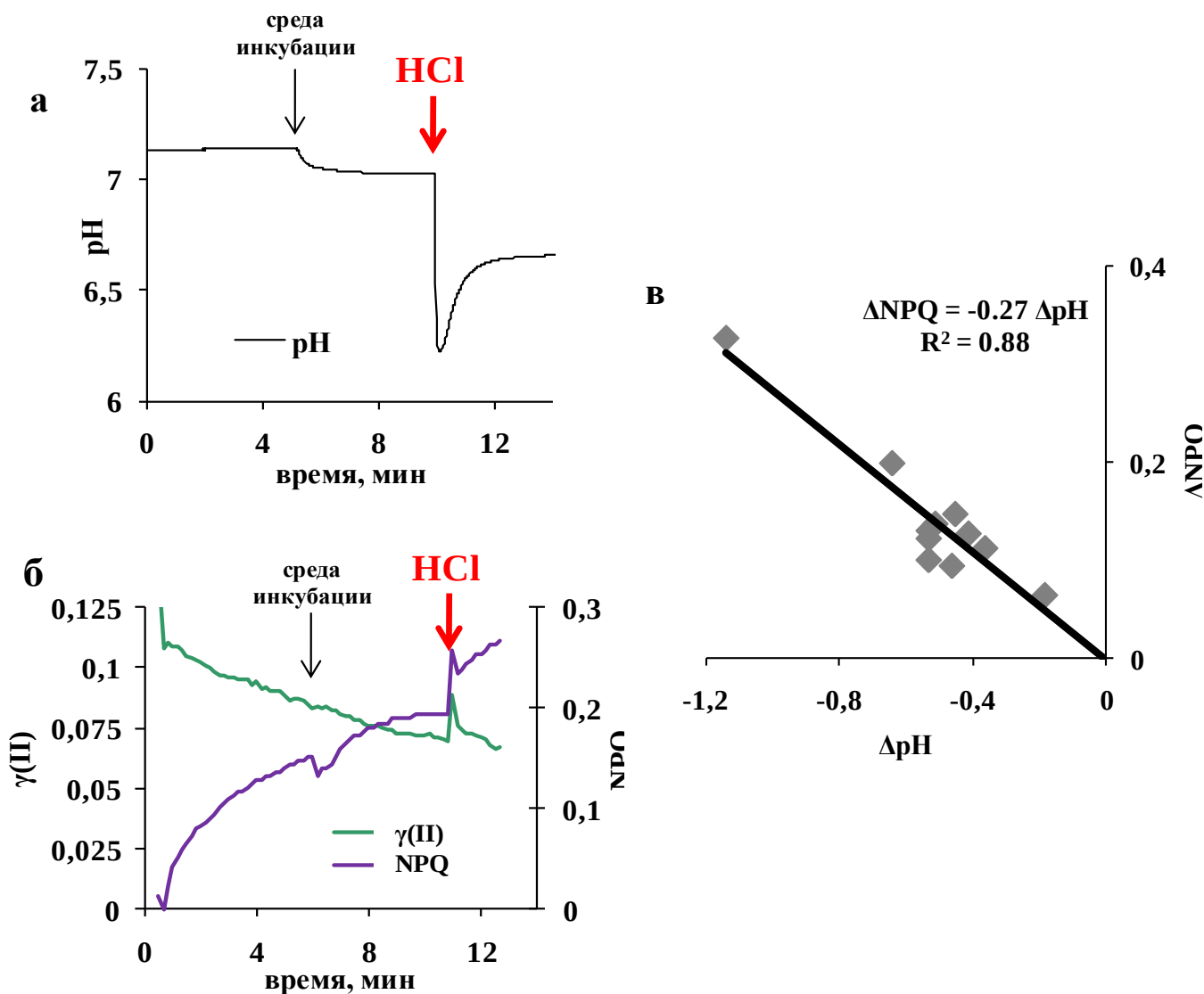


Рис. 5.6. Изменения фотосинтетических параметров хлоропластов при снижении рН омывающего их раствора ($n=11$)

а, б – пример записи изменений рН (**а**) и параметров фотосинтеза (**б**) в ответ на добавление HCl; **в** – зависимость возрастания NPQ от величины снижения рН.

Чёрная стрелка обозначает момент добавления среды выделения, красная стрелка – момент добавления HCl.

В то же время отсутствовали существенные изменения квантового выхода фотосистемы II (рис. 5.6б): при добавлении в суспензию кислоты происходило его кратковременное увеличение, после чего он возвращался к исходному уровню (~ 2 мин). Изменения $\gamma(I)$ не приведены, так как добавление растворов вызывало существенный артефакт. Как и в случае проростков гороха, динамика вызванных закислением среды инкубации изменений фотосинтетических параметров хлоропластов тыквы согласуется с динамикой вызванного ВП фотосинтетического ответа у интактных проростков, что является аргументом в пользу универсальности исследуемого механизма.

Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что формирование вызванного ВП фотосинтетического ответа связано с изменениями pH цитоплазмы и апопласта, имеющими место при генерации ВП. При этом различия в динамиках изменений фотосинтетических параметров и в выраженности фотосинтетических ответов у растений разных видов позволяет предположить существование различных механизмов влияния ВП и сопровождающих его изменений pH на фотосинтез. С одной стороны, изменение pH апопласта и цитоплазмы может вызывать снижение соотношения $\text{CO}_2:\text{HCO}_3^-$, а также влиять на активность карбоангидраз и аквапоринов, затрудняя поступление CO_2 в клетку и вызывая снижение активности темновой стадии фотосинтеза (Булычев и др., 2001; Grams et al., 2009; Galle et al., 2013). В то же время, pH-оптимум ферментов цикла Кальвина находится в области слабощелочных значений (Wolosiuk et al., 1993), и снижение pH стромы хлоропластов, которое, вероятно, имеет место при закислении цитоплазмы, может приводить к подавлению ассимиляции CO_2 . Закисление стромы также может приводить к аккумуляции ферредоксин-НАДФ-редуктазы в комплексах Tic62 и TROL тилакоидных мембран (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010), нарушая поток электронов по электрон-транспортной цепи. С другой стороны, снижение активности фотосинтеза может быть обусловлено входом протонов в люмен и ростом потерь энергии в антенных комплексах, реализующихся за счёт

возрастания нефотохимического тушения флуоресценции (Maxwell, Johnson, 2000).

5.3. Анализ путей влияния изменений внутри- и внеклеточного pH на фотосинтетические процессы при генерации переменного потенциала

Для анализа путей влияния сопровождающих развитие ВП изменений pH на фотосинтетические процессы было проведено сравнение их динамик. Как показано на рис. 5.7, изменения внеклеточного pH хорошо коррелировали с изменениями уровня ассимиляции CO₂: величина коэффициента корреляции r составляла $-0,72$. В то же время динамика изменений внутриклеточного pH существенно отличалась от динамики ответа газообмена ($r = 0.31$). С другой стороны, при сравнении динамик изменений pH и возрастания NPQ наблюдалась высокая корреляция между снижением внутриклеточного pH и ростом NPQ ($r = -0.92$), в то время как динамики изменений pH апопласта и NPQ существенно расходились ($r = 0.35$).

Такие результаты позволяют предположить существование двух путей влияния изменений pH на фотосинтетическую активность при развитии ВП у проростков гороха. Первый путь связан главным образом с изменениями газообмена и реализуется за счёт увеличения внеклеточного pH. Второй путь обусловлен снижением внутриклеточного pH и проявляется в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции.

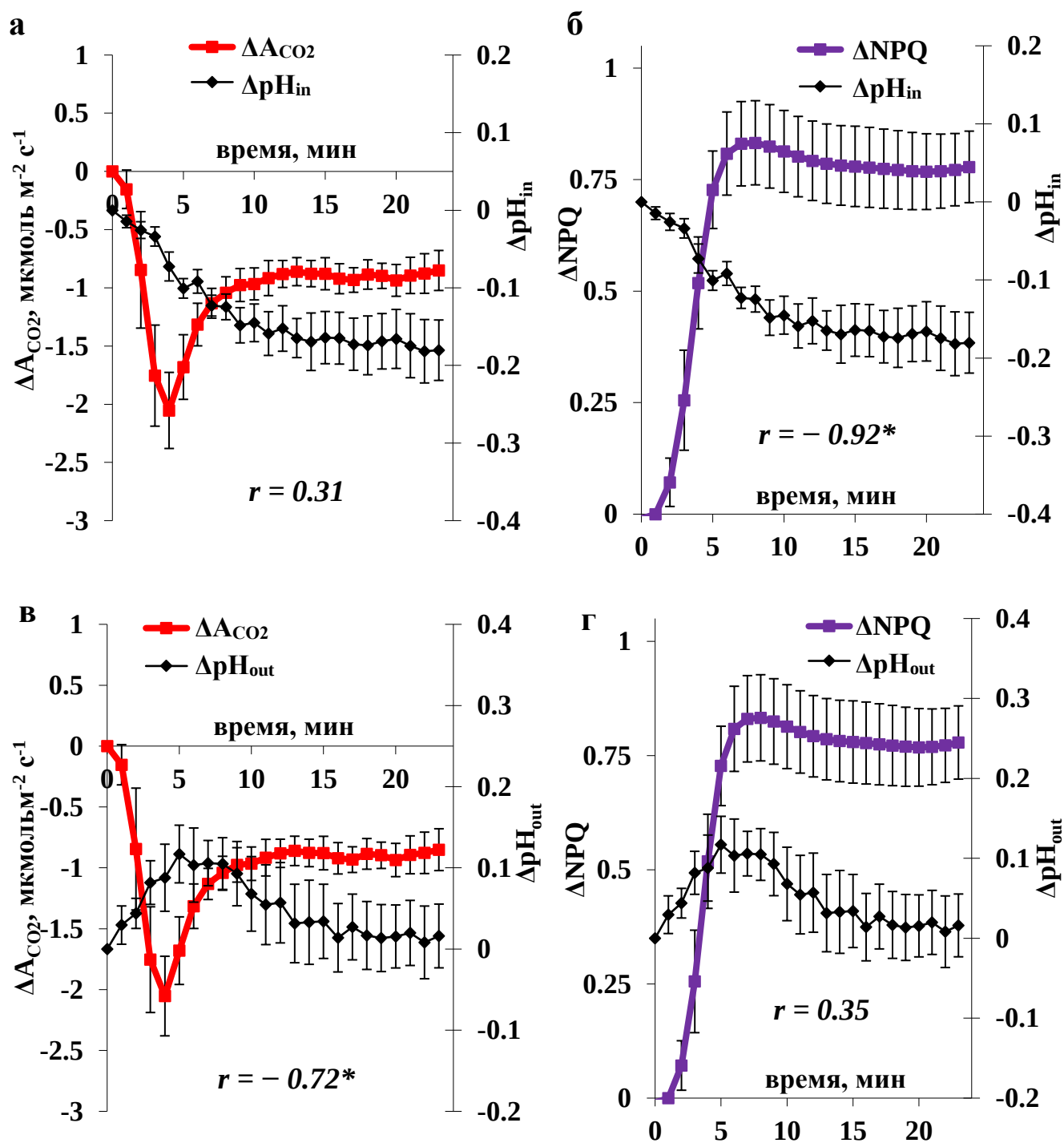


Рис. 5.7. Изменения рН при развитии переменного потенциала, сопоставленные с изменениями фотосинтетических показателей в условиях контрольной концентрации CO_2 у проростков гороха ($n = 5-6$), * – $p < 0.05$

Для устранения участия инактивации темновой стадии фотосинтеза в развитии ответа мы снижали концентрацию CO_2 вокруг листа с 360 мкл л^{-1} до $\sim 15 \text{ мкл л}^{-1}$. Согласно Sukhov et al. (2012, 2014), инактивация темновой стадии

фотосинтеза, индуцированная развитием ВП, не участвует в формировании фотосинтетического ответа в таких условиях. Было показано (рис. 5.8), что в условиях пониженной концентрации внешнего CO_2 динамика возрастания внеклеточного pH слабо связана с изменениями уровня ассимиляции CO_2 ($r = -0.45$) и NPQ ($r = -0.18$), в то время как корреляция между изменениями внутриклеточного pH и увеличением NPQ становилась максимальной ($r = -0.97$). Коэффициент корреляции между динамиками внутриклеточного pH и уровня ассимиляции CO_2 оставался низким ($r = 0.33$).

Чтобы учесть вклад дыхания в индуцированный ВП ответ газообмена, мы анализировали изменения A_{CO_2} и их связь с изменениями pH в условиях полного затемнения исследуемого листа. При этом величина вызванных ВП изменений газообмена в темноте была сходна с величиной таких изменений в условиях низкой концентрации CO_2 (рис. 5.9). Однако коэффициент корреляции между возрастанием pH апопласта и изменением A_{CO_2} в темноте оставался достаточно высоким ($r = 0.72$), что говорит о возможном участии сдвига внеклеточного pH в развитии ответа дыхания, вызванного ВП.

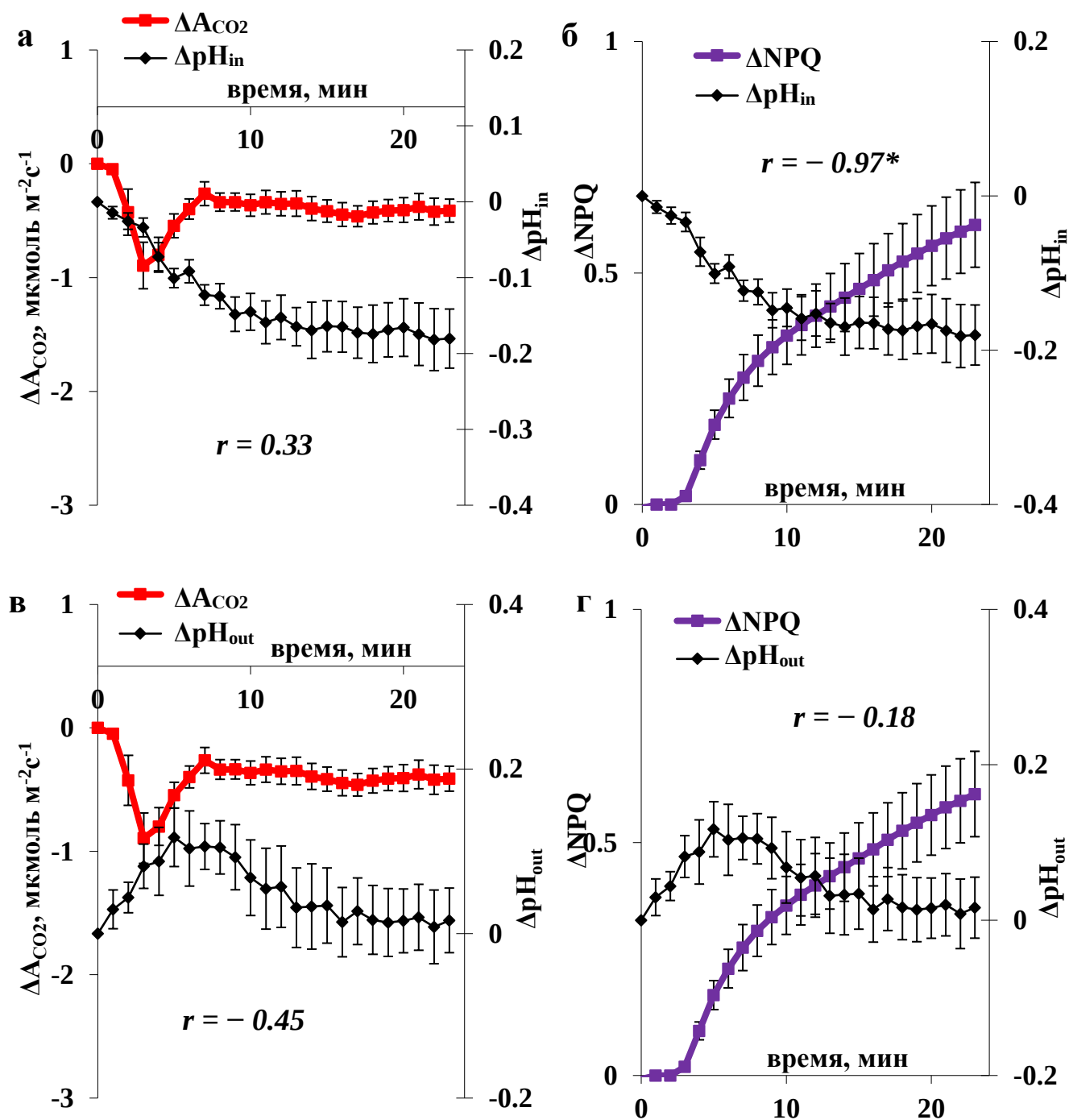


Рис. 5.8. Изменения рН при развитии переменного потенциала, сопоставленные с изменениями фотосинтетических показателей в условиях низкой концентрации CO₂ у проростков гороха ($n = 5-7$), * – $p < 0.05$

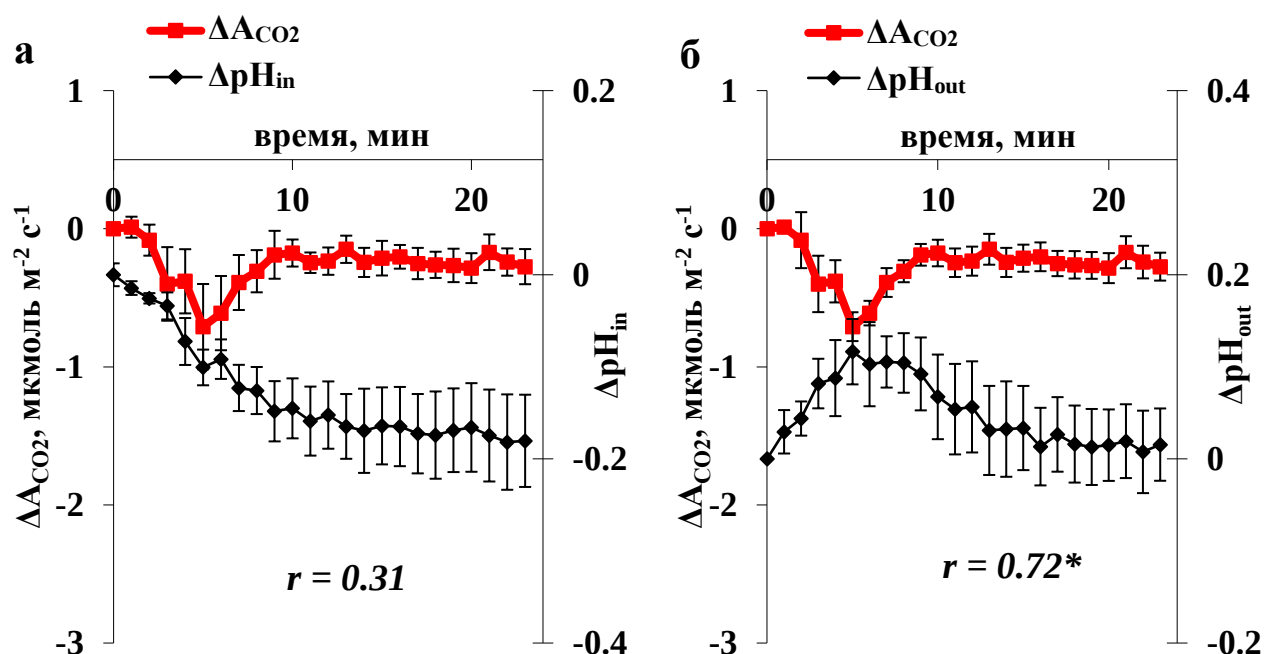


Рис. 5.9. Изменения рН при развитии переменного потенциала, сопоставленные с изменениями газообмена в условиях отсутствия освещения у проростков гороха ($n = 5-6$), * – $p < 0.05$

Сравнение фотосинтетических ответов при контрольной и низкой концентрации CO_2 с динамикой рН апопласта показало, что увеличение NPQ, не связанное со снижением активности цикла Кальвина, может быть вызвано сопровождающим развитие ВП закислением цитоплазмы. Рост рН апопласта при ВП, вероятно, обуславливает быструю инактивацию темновой стадии фотосинтеза, что может способствовать формированию быстрых начальных изменений нефотохимического тушения флуоресценции.

Для того, чтобы выделить из общего ответа фотосинтеза компоненту, связанную с инактивацией темновой стадии, мы рассчитали разность между изменениями фотосинтетических параметров в условиях контрольной и низкой концентрации внешнего CO_2 (рис. 5.10). Было показано, что динамики изменений A_{CO_2} и нефотохимического тушения флуоресценции имели выраженный максимум ($\sim$ через 5 мин после ожога). Кроме того, наблюдалась высокая корреляция между рН апопласта и изменениями газообмена ($r = -0.83$), а также между рН апопласта и ответом NPQ ($r = 0.84$), в то время как связь между

динамикой pH цитоплазмы и параметрами фотосинтеза оставалась незначительной ($r = 0.27$ для A_{CO_2} и $r = -0.46$ для NPQ).

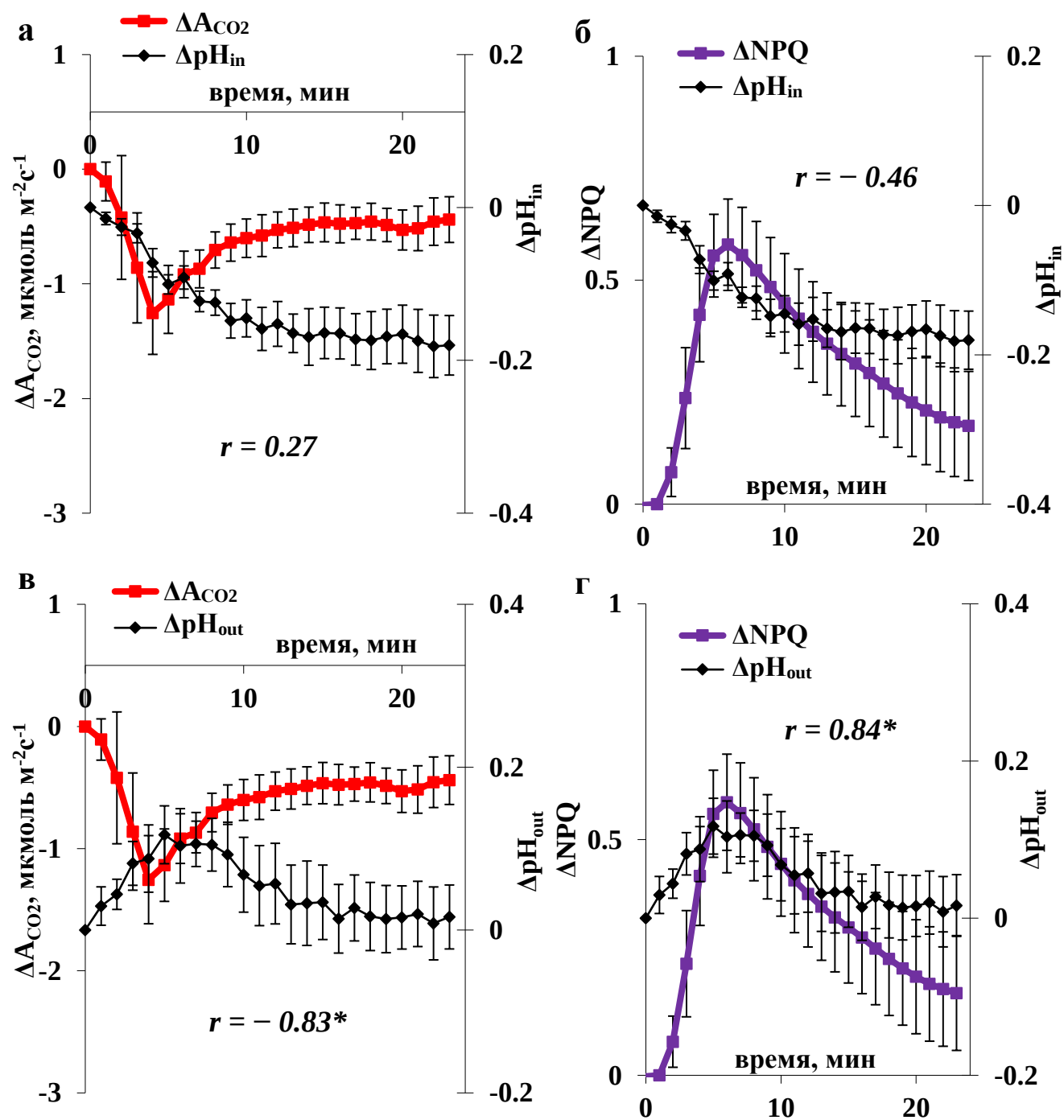


Рис. 5.10. Изменения pH при развитии переменного потенциала, сопоставленные с разностями изменений фотосинтетических показателей в контрольных условиях и в условиях низкой концентрации CO_2 у проростков гороха ($n = 5-7$), * – $p < 0.05$

Чтобы исключить вклад ответа дыхания в индуцированные ВП изменения газообмена, мы рассчитали разность между изменениями A_{CO_2} в контрольных условиях и условиях отсутствия освещения (данные не приведены). Было показано хорошее соответствие изменений данного показателя и pH апопласта ($r = -0.63$). В то же время, корреляция между динамикой исследуемой разности и pH цитоплазмы была низкой ($r = -0.27$). Такие результаты подтверждают связь между изменениями внеклеточного pH и уровня ассимиляции CO_2 при развитии ВП.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить существование двух компонент вызванного ВП фотосинтетического ответа у проростков гороха. Одна из компонент связана со снижением активности темновых реакций фотосинтеза и зависит от динамики изменений pH апопласта. Другая компонента обусловлена сопровождающим ВП сдвигом внутриклеточного pH и проявляется в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции.

Связь вызванного ВП снижения ассимиляции CO_2 со сдвигом pH апопласта в щелочную сторону может быть обусловлена уменьшением проводимости мезофилла листа для CO_2 . Одним из вероятных механизмов снижения поступления CO_2 в клетку может быть снижение соотношения $CO_2:HCO_3^-$, опосредованное сопровождающим генерацию ВП защелачиванием апопласта. Так как транспорт заряженных веществ, в том числе ионов HCO_3^- , через плазматическую мембрану сильно затруднён, углекислый газ может входить в клетку по большей части в незаряженной форме (Булычев и др., 2001; Tholen, Zhu, 2011). Пренебрегая обратным переносом CO_2 из клетки в среду, его поток через плазматическую мембрану в цитоплазму (J_{CO_2}) можно описать уравнением (3):

$$J_{CO_2} = kC \frac{1}{1 + 10^{pH_a - pK}}, \quad (3)$$

где C – общая концентрация CO_2 , $pK = 6,35$ – отрицательный десятичный логарифм константы равновесия реакции $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ (Булычев и др., 2001), pH_a – pH апопласта, k – константа пропорциональности, зависящая от проницаемости плазматической мембраны для CO_2 . Принимая, что C и k – постоянны, можно описать величину снижения потока CO_2 (ΔJ_{CO_2}) в цитоплазму при увеличении pH апопласта с помощью уравнения (4):

$$\Delta J_{\text{CO}_2}, \% = 100 \cdot \left(1 - \frac{1 + 10^{pH_a - pK}}{1 + 10^{pH_a + \Delta pH_a - pK}}\right), \quad (4)$$

где ΔpH_a – максимальная величина сдвига pH апопласта при ВП. Если принять, что изменения pH_a в условиях их регистрации и при развитии фотосинтетического ответа приблизительно равны, то, подставив в уравнение (4) зарегистрированные для проростков значения ($pH_a = 5,7$; $\Delta pH_a = 0,22$) (рис. 5.2), можно оценить снижение потока CO_2 , связанного с защелачиванием апопласта при ВП, которое составляет около 11%, значительно отличаясь от величины падения ассимиляции CO_2 (около 73%) при ВП. Таким образом, снижение поступления углекислого газа через плазматическую мембрану может быть одним из механизмов влияния изменения pH апопласта на фотосинтез, однако не обуславливает в значительной степени изменений газообмена в клетке.

С другой стороны, согласно Galle с соавт. (2013) защелачивание апопласта может влиять на работу аквапоринов, участвующих в транспорте CO_2 (Uehlein et al., 2003, 2008) и зависящих от pH (Luu, Maurel, 2005), однако данная гипотеза требует дальнейших исследований.

Механизмы влияния закисления цитоплазмы на световую стадию фотосинтеза также недостаточно ясны. Снижение pH цитоплазмы, вероятно, приводит к закислению стромы хлоропластов (Werdan et al., 1975), что может влиять на активность ферредоксин-НАДФ-редуктазы и поток электронов через фотосистему I (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010), вызывая снижение $\gamma(I)$. Из стромы протоны могут проходить в люмен, снижая его pH и увеличивая

нефотохимическое тушение флуоресценции (Maxwell, Johnson, 2000; Muller et al., 2001). В то же время, не исключены и другие пути влияния изменений pH на световые реакции фотосинтеза.

5.4. Теоретический анализ участия изменений внутри- и внеклеточного pH в развитии вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа

Полученные нами экспериментальные результаты показывают, что изменения pH могут играть ключевую роль в развитии фотосинтетического ответа. При этом пути влияния внутри- и внеклеточного pH на активность фотосинтеза, по-видимому, различны. Однако остаётся нерешенным ряд важных вопросов. В частности, неясен характер зависимости параметров активности световой и темновой стадий фотосинтеза от величины изменений pH внутри и снаружи клетки.

Для теоретического анализа механизмов влияния переменного потенциала на фотосинтез была использована математическая модель ВП (Sukhov et al., 2013) (рис. 5.1), учитывающая работу потенциал- и лиганд-зависимых ионных каналов, H^+ - и Ca^{2+} -АТФ-аз, $2H^+/Cl^-$ -симпортера и H^+/K^+ -антипортера на плазматической мембране, а также Ca^{2+} -опосредованную инактивацию H^+ -АТФ-азы и активацию Cl^- -каналов. Также в модели учитывались буферные свойства апопласта и цитоплазмы на основе работы Gradmann (2001) с модификациями, предложенными в работе (Sukhov, Vodeneev, 2009). Известно (Grignon, Sentenac, 1991), что в клеточной стенке высших растений содержится большое количество глюкуроновых кислот, несущих отрицательный заряд. На основе этого было принято допущение (Gradmann, 2001), что апопласт растения, включающий в себя клеточную стенку, несет фиксированный отрицательный заряд и может конкурентно связывать положительно заряженные ионы H^+ и K^+ .

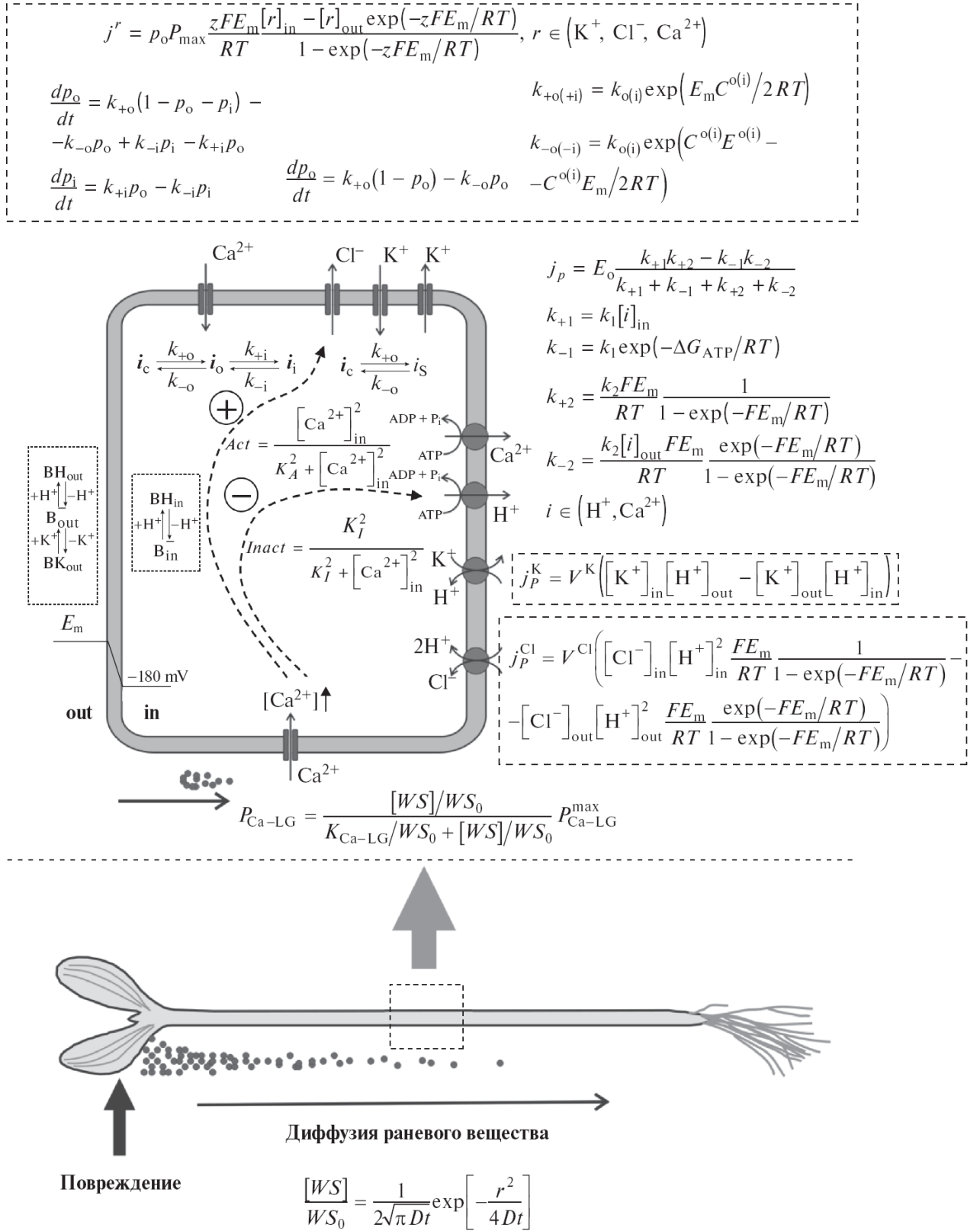


Рис. 5.11. Электрофизиологическая схема растительной клетки, учитывающая диффузию раневого вещества, и основные уравнения, использованные в модели ВП (на основе (Sukhov et al., 2013), с небольшими модификациями).

Рис. 5.11. (Окончание) E_m – электрический потенциал плазматической мембраны, $P_{\max}$ – максимальная проницаемость ионного канала, p_o и p_i – вероятности нахождения ионного канала в открытом и инактивированном состоянии, соответственно, $k_{+o(+i)}$ и $k_{-o(-i)}$ – константы скоростей переходов ионного канала из закрытого в открытое состояние и обратно (o) или из открытого в инактивированное и обратно (i), $k_{o(i)}$ – константа скорости перехода между закрытым и открытым (открытым и инактивированным) состояниями при нулевых значениях E_m и $E^{o(i)}$, $C^{o(i)}$ – константа, отражающая заряд воротной структуры и величину ее смещения, необходимого для переходов закрытое–открытое (открытое–инактивированное) состояния, $E^{o(i)}$ – значение потенциала, необходимого для перехода половины каналов в открытое (инактивированное) состояние, Act – коэффициент Ca^{2+} -опосредованной активации Cl^- -каналов, K_A – константа связывания ионов Ca^{2+} Cl^- -каналами, E_o – концентрация H^+ - или Ca^{2+} -АТФ-азы, k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , и k_{-2} – константы скоростей прямых и обратных переходов между двумя состояниями ионной АТФ-азы, k_1 и k_2 – константы скорости переходов между состояниями ионной АТФ-азы при нулевом E_m и концентрациях ионов 1 М, $Inact$ – коэффициент инактивации H^+ -АТФ-азы ионами Ca^{2+} , K_I – константа связывания ионов Ca^{2+} с H^+ -АТФ-азой, V^{Cl} и V^K – общие константы скоростей $2H^+/Cl^-$ -симпортера и H^+/K^+ -обменника, соответственно, B_{in}^- и BH_{in} – свободные и связанные с ионами H^+ буферные молекулы в цитоплазме, B_{out}^- , BH_{out} , и BK_{out} – свободные, связанные с ионами H^+ и K^+ буферные молекулы в апопласте, $P_{Ca-LG}^{\max}$ – максимальная проницаемость лигандзависимых Ca^{2+} -каналов, K_{Ca-LG} – константа диссоциации для комплекса раневого вещества и лигандзависимого Ca^{2+} -канала, $[WS]$ и WS_0 – концентрация раневого вещества и его начальное количество, выделившееся при повреждении, D – коэффициент турбулентной диффузии раневого вещества, r и t – расстояние от зоны повреждения и время, прошедшее с момента повреждения. Пунктирными стрелками отмечена кальциевая регуляция транспортных систем: положительное влияние (+) ионов Ca^{2+} на Cl^- -каналы и их отрицательное влияние (–) на H^+ -АТФазу.

Для описания влияния pH на фотосинтез в математическую модель ВП (рис. 5.11) были включены регрессионные уравнения, полученные на основе экспериментальных данных, описанных в разделе 5.3. В частности, на основе данных корреляционного анализа, представленных на рис. 5.7, были выявлены зависимости величин изменений фотосинтетических параметров ΔA_{CO_2} и ΔNPQ от величин сопровождающих развитие ВП изменений pH – ΔpH_{out} и ΔpH_{in} , соответственно (рис. 5.12). Для оценки зависимостей анализировали динамику ΔpH_{out} , ΔpH_{in} , ΔA_{CO_2} и ΔNPQ перед раздражением (2 мин), во время раздражения и после индукции ВП (10 мин). За нулевой уровень принимали значения показателей в момент, непосредственно предшествующий повреждению.

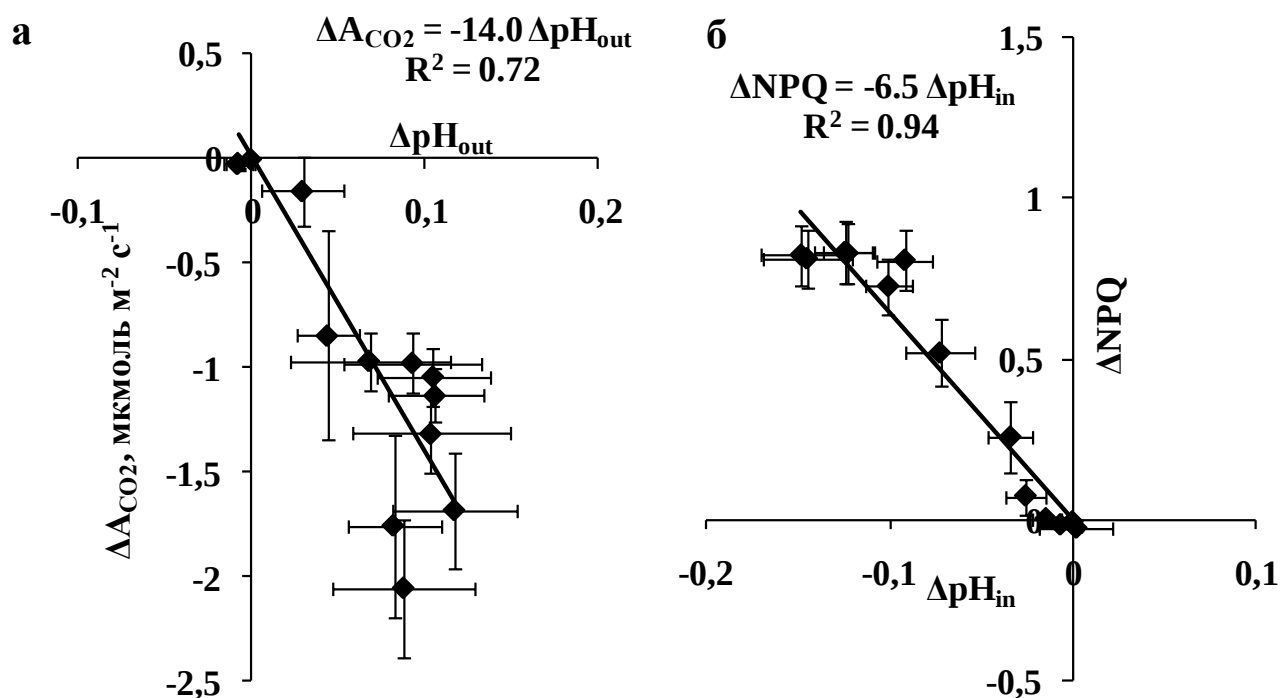


Рис. 5.12. Зависимость вызванного ВП снижения уровня ассимиляции CO_2 (ΔA_{CO_2}) от увеличения внеклеточного pH (ΔpH_{out}) (а) и увеличения нефотохимического тушения флуоресценции (ΔNPQ) от снижения внутриклеточного pH (ΔpH_{in}) (б). R^2 – коэффициент детерминации

Было показано, что данные зависимости хорошо описываются линейными функциями (5) и (6) (коэффициент детерминации больше 0.70):

$$\Delta A_{\text{CO}_2} = -14.0 \Delta \text{pH}_{\text{out}} \quad (5)$$

$$\Delta \text{NPQ} = -6.5 \Delta \text{pH}_{\text{in}} \quad (6)$$

где все изменения рассчитываются относительно величины показателя, предшествующей развитию ВП. Уравнения (5) и (6) были использованы в модели для описания сопровождающих развитие ВП изменений ассимиляции CO_2 и нефотохимического тушения флуоресценции.

На первом этапе анализа была проведена оценка способности модели, в которой учитывалась линейная связь между изменениями рН и параметрами фотосинтеза, описывать типичный фотосинтетический ответ высшего растения. Для этого имитированные моделью изменения A_{CO_2} и NPQ сравнивали с изменениями этих параметров, наблюдаемыми в эксперименте.

На рис. 5.13 видно, что экспериментально полученные и описанные моделью фотосинтетические ответы показали качественное сходство. Так, вызванные повреждением изменения мембранного (модель) и поверхностного (эксперимент) потенциала включали в себя начальное импульсное изменение и более медленную и длительную деполяризацию (рис. 5.13а, в), что соответствует литературным данным о форме переменного потенциала (Sukhov et al., 2012, 2014).

Анализ вызванных генерацией ВП фотосинтетических ответов в модели показал, что при имитации развития ВП происходило быстрое снижение уровня ассимиляции CO_2 и последующее медленное повышение до уровня, близкого к исходному (рис. 5.13б). NPQ показало более медленный рост и дальнейшее незначительное уменьшение в течение исследуемого времени. Такие формы ответов хорошо согласуются с данными литературы (Pavlovic et al., 2011; Sukhov et al., 2012, 2014) и качественно повторяют вызванный ВП фотосинтетический ответ проростков гороха в эксперименте (рис. 5.13г). Качественное сходство вызванных повреждением изменений электрической и фотосинтетической

активности в эксперименте и модели свидетельствует в пользу адекватности использованного для данного анализа предположения о линейной связи сдвигов внутри- и внеклеточного pH с изменениями параметров NPQ и A_{CO_2} (в соответствии с уравнениями (5) и (6)).

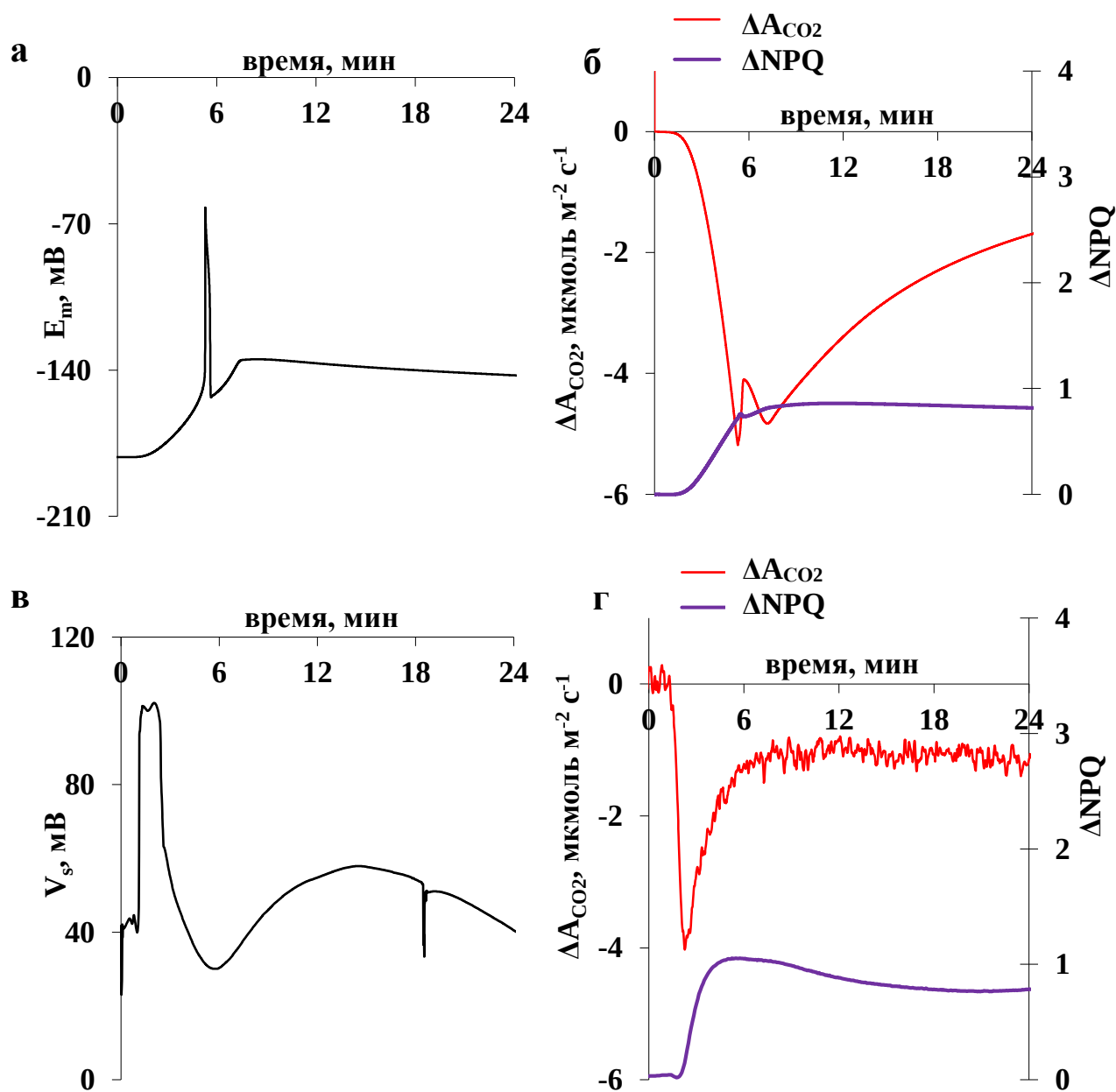


Рис. 5.13. Описанные моделью (а, б) и экспериментальные (в, г) изменения электрического потенциала, ассимиляции CO_2 и нефотохимического тушения флуоресценции на расстоянии 10 см от зоны повреждения ($n = 35$)

Такие данные подтверждают гипотезу о рН-опосредованном развитии фотосинтетического ответа на ВП, а также свидетельствуют в пользу существования двух компонент такого ответа, связанных с различным влиянием рН цитоплазмы и апопласта на световую и темновую стадии фотосинтеза. Для дальнейшей проверки этой гипотезы мы исследовали зависимость величины изменений A_{CO_2} и NPQ от амплитуды ВП.

Было показано, что при увеличении амплитуды ВП путём повышения параметра модели K_{Ca-LG}/WS_0 , что имитировало рост начального выхода раневого вещества, на начальных этапах происходит увеличение амплитуды ответа A_{CO_2} и NPQ (рис. 5.14). При достижении достаточно большой амплитуды ВП величины изменений NPQ выходят на постоянный уровень, а изменения A_{CO_2} достигают максимальных значений, после чего несколько снижаются. Экспериментально полученные ответы этих параметров качественно не отличаются от теоретических (рис. 5.13б). Так, с увеличением амплитуды ВП наблюдается рост ΔNPQ , который достигает насыщения при больших величинах изменения потенциала. При низких и средних амплитудах ВП наблюдается увеличение ΔA_{CO_2} с ростом амплитуды ВП, которое сменяется недостоверным снижением данного параметра при достижении больших величин электрического ответа. Такая тенденция отражает некоторое снижение амплитуды изменений рН апопласта при большой амплитуде ВП. В частности, при развитии ВП с амплитудой 50 мВ рН увеличивается на 0.36 ед., а при амплитуде 80 мВ – 0.30 ед. рН, что может быть связано с большим выходом ионов калия из клетки при большей амплитуде ВП. Так, развитие ВП с амплитудой 50 мВ сопровождается увеличением концентрации ионов K^+ в апопласте на 8 мМ, а при амплитуде 80 мВ – на 10 мМ. Рост концентрации K^+ может уменьшать связывание протонов буфером, так как ионы K^+ способны конкурентно с ним связываться и тем самым увеличивать концентрацию протонов в апопласте.

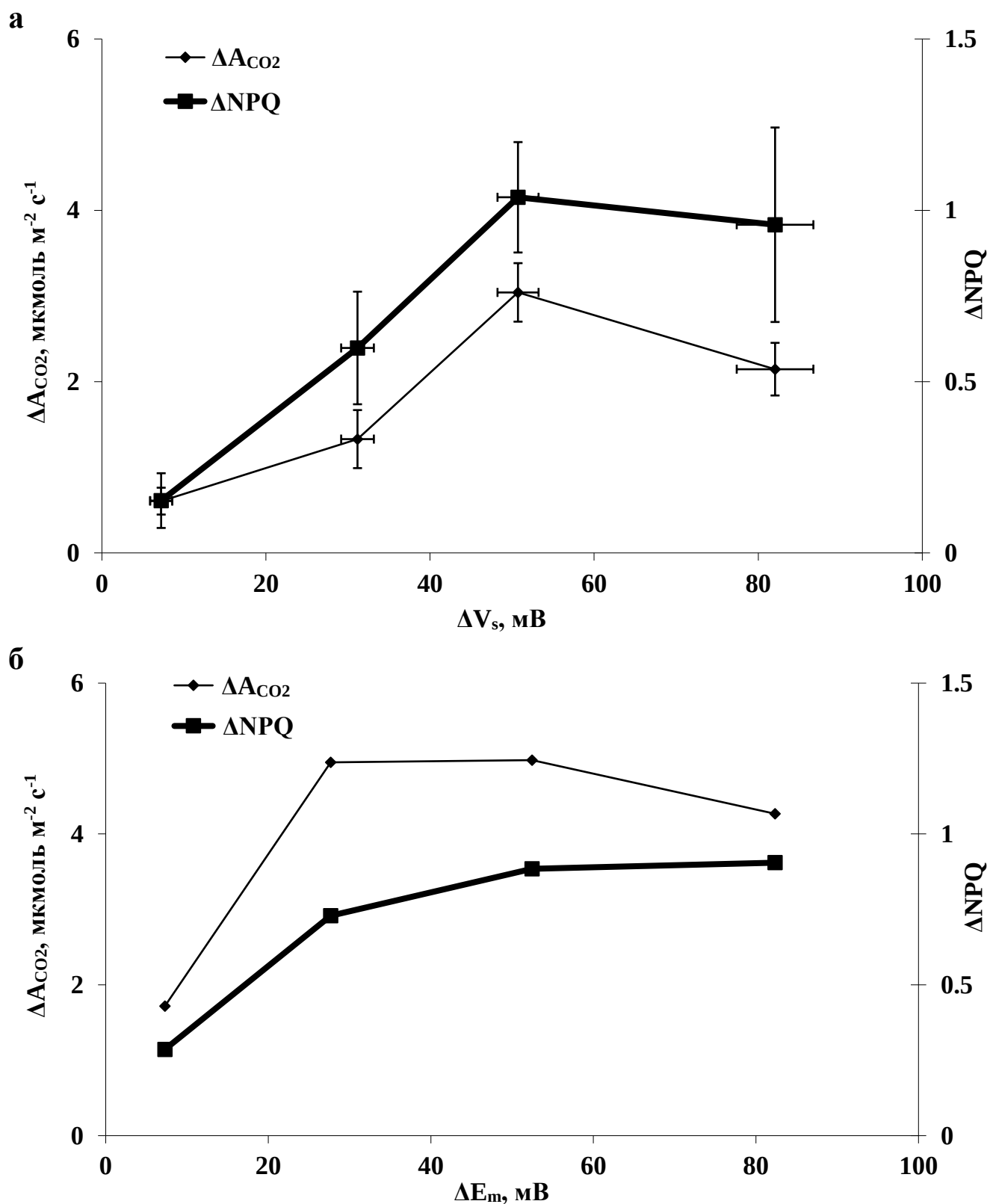


Рис. 5.14. Теоретическая (а) и экспериментальная (б) ($n = 8-9$) зависимости изменений ассимиляции CO_2 (ΔA_{CO_2}) и нефотохимического тушения флуоресценции (ΔNPQ) от амплитуды переменного потенциала

Таким образом, полученный результат показывает адекватность применения разработанной модели для описания индуцированных ВП фотосинтетических ответов. Кроме того, данная модель хорошо описывает зависимость величины изменений фотосинтетических параметров от амплитуды ВП, в частности, насыщение и снижение величины ответа при возрастании амплитуды ВП.

Далее производилось сравнение экспериментальных и имитированных моделью электрических и фотосинтетических ответов на больших расстояниях от зоны повреждения (рис. 5.15). Было показано, что на расстоянии 22 см от зоны повреждения как в модели, так и в эксперименте наблюдаются незначительные по амплитуде изменения электрической активности (рис. 5.15в). Кроме того, слабая выраженность изменений фотосинтетических параметров, полученных теоретически (рис. 5.15б), хорошо имитирует практически полное отсутствие таких изменений в эксперименте (рис. 5.15г).

Таким образом, математическая модель ВП, модифицированная с учётом экспериментально полученных линейных зависимостей фотосинтетических параметров от изменений внутри- и внеклеточного рН, хорошо качественно имитирует вызванные повреждением электрический и фотосинтетический ответы и существенное подавление таких ответов на большом расстоянии от зоны повреждения, а также зависимости величины изменений фотосинтетической активности от амплитуды переменного потенциала. Можно предположить, что количественные несоответствия теоретических и экспериментальных результатов обусловлены тем, что используемая для анализа математическая модель (Sukhov et al., 2013) разработана как универсальная модель ВП у высших растений, а большинство экспериментов для её верификации проводилось на проростках тыквы. Теоретически полученные результаты сопоставлялись с экспериментальными данными, полученными на проростках гороха, количественные характеристики фотосинтетических ответов которых отличаются от таковых у проростков тыквы. В частности, при близких величинах электрических ответов изменения параметров фотосинтеза у тыквы значительно

менее выражены, чем у гороха (Глава 3). С другой стороны, адекватное качественное описание вызванных повреждением изменений параметров фотосинтеза свидетельствует в пользу корректности полученных в рамках настоящего исследования и включённых в модель зависимостей.

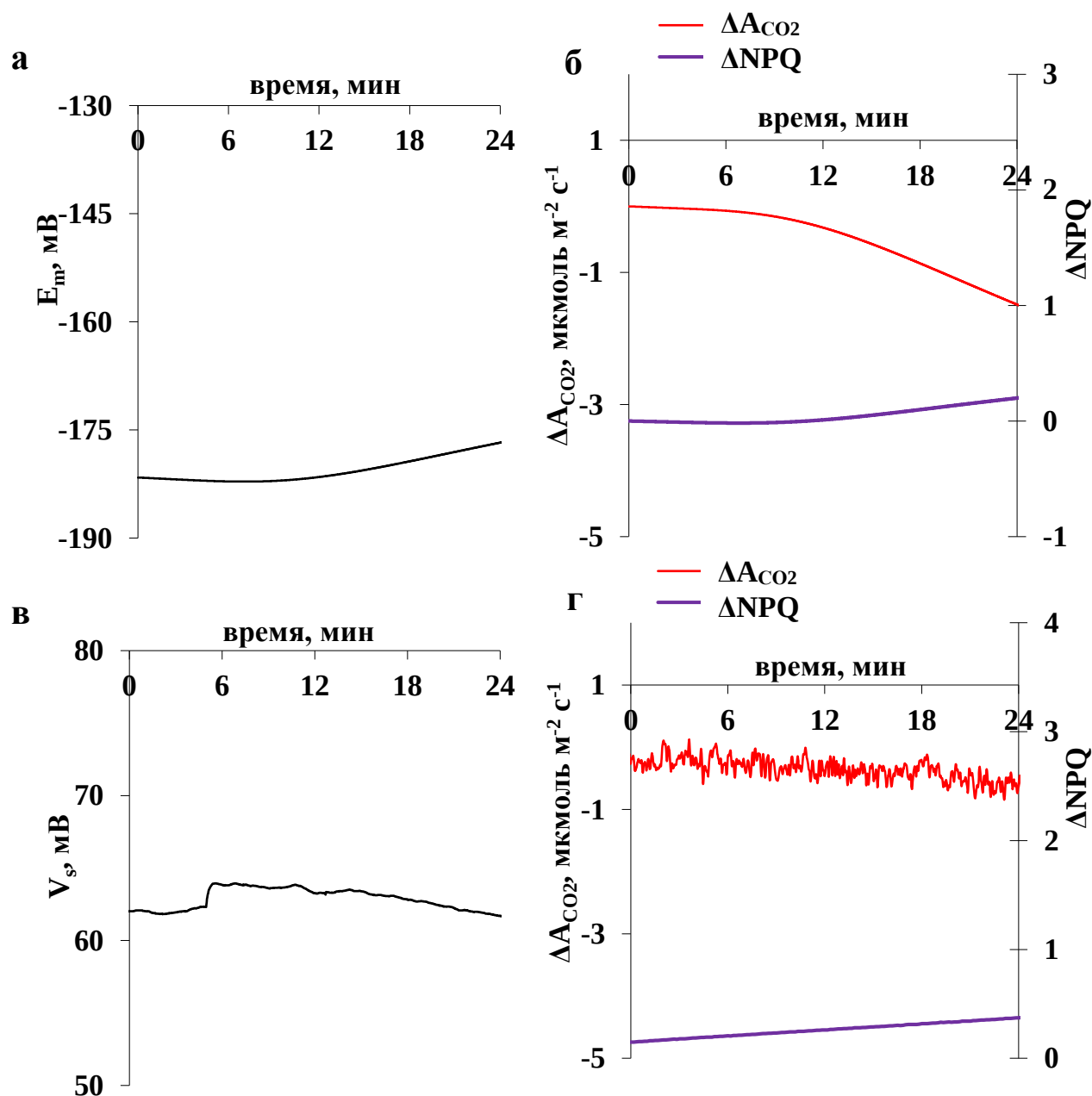


Рис. 5.15. Описанные моделью (а, в) и экспериментальные (б, г) изменения электрического потенциала, ассимиляции CO_2 и нефотохимического тушения флуоресценции на расстоянии 22 см от зоны повреждения ($n = 6$)

Таким образом, результаты теоретического анализа с использованием математической модели переменного потенциала являются аргументом в пользу существования двух путей влияния сопровождающих развитие переменного потенциала изменений pH: один из них связан с закислением цитоплазмы и реализуется, по-видимому, в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции; другой путь опосредован повышением pH апопласта, что, вероятно, является механизмом снижения ассимиляции CO₂. Кроме того, полученные результаты позволяют предположить, что сдвиги внутри- и внеклеточного pH не только запускают развитие фотосинтетического ответа при ВП, но и влияют на динамику фотосинтетического ответа на протяжении всего исследуемого времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных в работе результатов и данных, представленных в литературе, была разработана общая схема участия сдвигов внутри- и внеклеточной концентрации протонов в развитии вызванных ВП изменений фотосинтетической активности (рис. 6.1). В соответствии с ней, локальное повреждение вызывает генерацию и распространение ВП в интактные части растения (результаты настоящего исследования; Sukhov et al., 2012, 2014; Surova et al., 2016a). Развитие ВП запускается открытием Ca^{2+} -каналов и входом ионов Ca^{2+} в клетку (Zimmermann, Felle, 2009; Furch et al., 2009; Воденеев и др., 2011; Katicheva et al., 2014, 2015). Увеличение концентрации кальция в цитоплазме вызывает переходную инактивацию H^+ -АТФазы плазматической мембраны (Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2011), что приводит к временному защелачиванию апопласта и закислению цитоплазмы (результаты настоящего исследования; Grams et al., 2009; Zimmermann, Felle, 2009; Воденеев и др., 2011). Увеличение pH апопласта может вызывать сдвиг соотношения $\text{CO}_2:\text{HCO}_3^-$, а также влиять на активность карбоангидраз и аквапоринов, нарушая транспорт CO_2 через плазматическую мембрану и снижая его вход в клетку, что вызывает подавление активности цикла Кальвина (Булычев и др., 2001; Grams et al., 2009; Galle et al., 2013). С другой стороны, закисление цитоплазмы, по-видимому, приводит к снижению pH стромы хлоропластов (Werdan et al., 1975). Такое снижение может подавлять активность ферментов цикла Кальвина, pH-оптимум которых находится в области слабощелочных значений (Wolosiuk et al., 1993). В свою очередь, уменьшение активности темновой стадии фотосинтеза, вероятно, приводит к росту соотношений АТФ:АДФ и НАДФН:НАДФ⁺ (Pavlovic et al., 2011; Sukhov, 2016). Кроме того, закисление стромы способствует аккумуляции ферредоксин-НАДФ-редуктазы в мембранных белковых комплексах Tic62 и TROL (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010), а также снижению её сродства к НАДФ⁺ (Lee et al., 2007). Эти процессы вызывают торможение нециклического потока электронов и усиливают работу циклического потока (Sukhov, 2016).

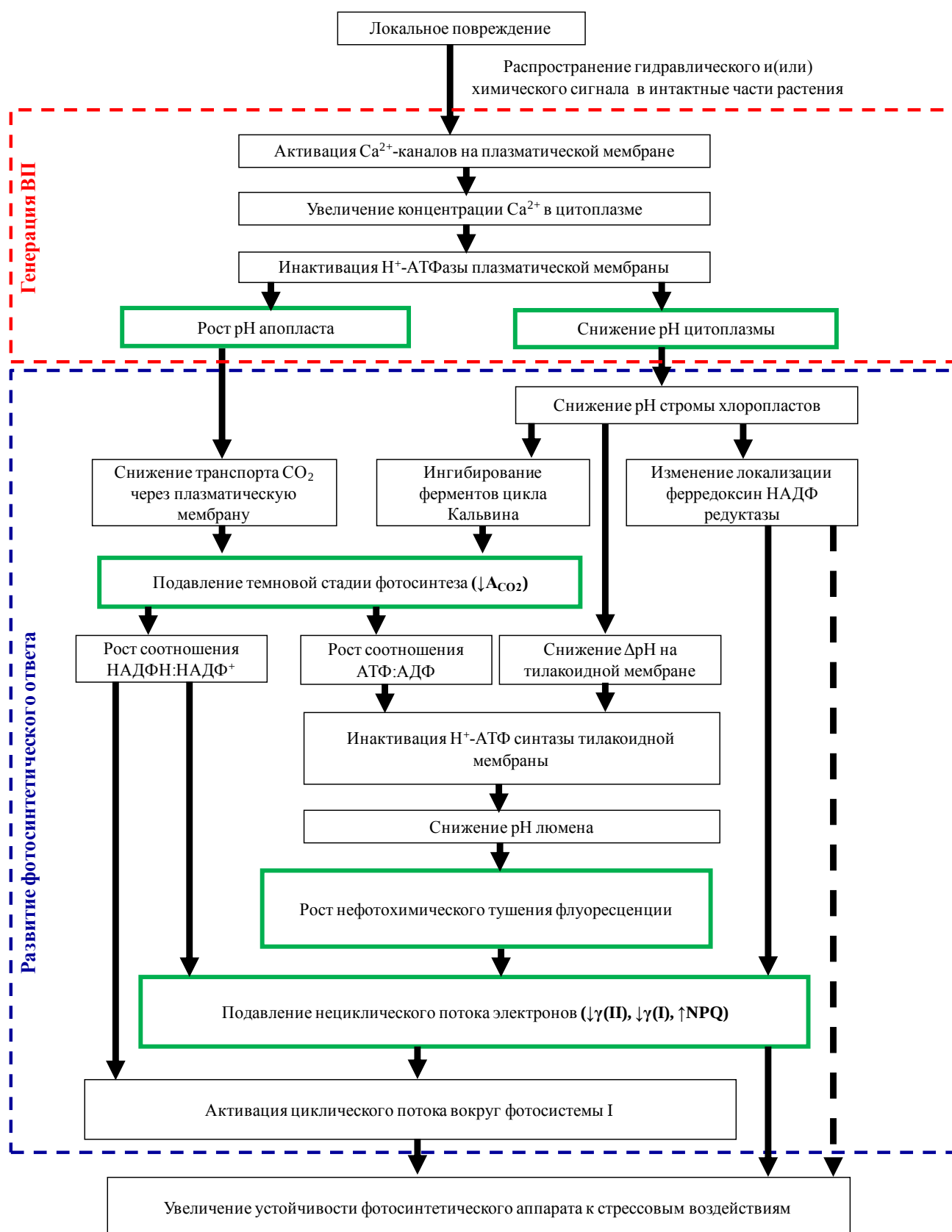


Рис. 6.1. Потенциальная схема участия сдвигов внутри- и внеклеточного pH в реализации влияния переменного потенциала на фотосинтез высших растений

Увеличение концентрации протонов в строме приводит к снижению ΔpH на тилакоидной мембране, что, в совокупности с ростом соотношения АТФ:АДФ снижает активность H^+ -АТФ синтазы и вызывает последующее закисление люмена. Снижение pH люмена вызывает рост нефотохимического тушения флуоресценции (Maxwell, Johnson, 2000) и снижение транспорта электронов через фотосистему II (Tikhonov, 2013), что приводит к усилению циклического потока вокруг фотосистемы I. Конечным итогом описанных процессов является увеличение устойчивости фотосинтетического аппарата к последующим стрессовым воздействиям (Sukhov et al., 2014, 2015; Surova et al., 2016a).

Отдельно следует отметить, что снижение активности темновой стадии фотосинтеза преимущественно связано с переходным увеличением pH апопласта и связанным с ним нарушением входа CO_2 в клетку. С другой стороны, снижение внутриклеточного pH оказывает существенное влияние на параметры световой стадии, которое может реализовываться как напрямую через изменение активности компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи, так и опосредованно вследствие подавления работы цикла Кальвина. Это указывает на возможность существования относительно независимых механизмов регуляции фотосинтетического ответа, что может иметь значение, в частности, для формирования специфических черт таких ответов на локальные стрессоры в зависимости от вида растения, его физиологического состояния и участка растения, в котором развивается ответ.

В то же время, остаётся неясным вклад отмеченных механизмов в формирование фотосинтетического ответа при ВП. Кроме того, перспективным представляется также раскрытие механизмов влияния ВП и вызванных им изменений активности фотосинтеза на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию неблагоприятных факторов. Знание этих механизмов в совокупности с результатами настоящего исследования может быть использовано при разработке методов модификации продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений.

ВЫВОДЫ

1. Вызванный локальным раздражением переменный потенциал вызывает быстрое обратимое угнетение фотосинтеза в интактных участках у проростков гороха и тыквы

2. Ингибиторный анализ показал участие инактивации H^+ -АТФазы плазматической мембраны в развитии вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа

3. Генерация переменного потенциала сопровождается обратимым защелачиванием апопласта и закислением цитоплазмы у проростков гороха (на 0.22 ± 0.02 ед. и 0.30 ± 0.05 , соответственно) и тыквы (на 0.40 ± 0.07 и 0.30 ± 0.10 ед., соответственно)

4. Искусственное изменение рН, сопоставимое по величине со сдвигом рН при ВП, вызывает фотосинтетический ответ, сходный с ответом, индуцированным переменным потенциалом; величина ответа при искусственном закислении зависит от величины сдвига рН

5. Выявлено две компоненты вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа, одна из которых обусловлена изменениями внеклеточного рН и связана с изменениями газообмена, а другая связана с изменениями рН внутри клетки и проявляется в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции

6. Разработана схема участия изменений внутри- и внеклеточного рН в развитии фотосинтетического ответа при ВП

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булычев А.А., Черкашин А.А., Вреденберг В., Рубин А.Б., Зыков В.С., Мюллер С.Х. Флуоресценция и фотосинтетическая активность хлоропластов в кислых и щелочных зонах клеток *Chara coralline* // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 384-391.
2. Булычев А.А., Алова А. В., Рубин А. Б. Изменения флуоресценции хлоропластов в клетках *Chara corallina*, связанные с передачей фотоиндуцированного сигнала с потоком цитоплазмы // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 1. С. 38-46.
3. Булычев А.А., Комарова А.В. Дистанционная передача сигналов и регуляция фотосинтеза в клетках *characeae* // Биохимия. 2014. Т. 79, № 3. С. 353-363.
4. Булычев А.А., Крупенина Н.А. Инактивация проводимости плазмалеммы в щелочных зонах *chara corallina* после генерации потенциала действия // Биологические мембраны. 2010. Т. 27. № 2. С. 209-217.
5. Воденеев В. А., Акинчиц Е. К., Орлова Л. А., Сухов В. С., Балалаева И. В. Регистрация изменений внеклеточного рН методом конфокальной микроскопии при генерации потенциалов возбуждения у высшего растения // Цитология. 2010. Т. 52. С. 549-554.
6. Воденеев В. А., Оприлов В. А., Пятыхин С. С. Обратимое изменение внеклеточного рН при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo* // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 538-545.
7. Воденеев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова Л.А., Сухов В.С. Анализ роли ионов Ca^{2+} , H^{+} и Cl^{-} в генерации переменного потенциала у растений тыквы // Физиология растений. 2011. Т. 58, №6. С. 826-833.
8. Найдов И.А. Исследование методом конфокальной микроскопии динамики светозависимой продукции H_2O_2 в протопластах фотосинтезирующих клеток высших растений: Автореф. дисс. канд.биол.наук. Пушкино, 2011. 88с.

9. Оприлов В.А., Лобов С.А., Пятыхин С.С., Мысягин С.А. Анализ возможности участия местных биоэлектрических реакций в рецепции охлаждения высшими растениями (на примере *Cucurbita pepo* L.) // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 905-912.
10. Оприлов В.А., Пятыхин С.С., Воденев В.А. Непосредственное сопряжение генерации потенциала действия в клетках высшего растения *Cucurbita pepo* L. с работой электрогенного насоса // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 160-165.
11. Оприлов В.А., Пятыхин С.С., Ретивин В.Г. Биоэлектрогенез у высших растений. М: Наука, 1991. 213 с.
12. Пикуленко М.М., Булычев А.А. Запускаемые светом потенциалы действия и изменения квантовой эффективности фотосистемы II в клетках *Anthoceros* // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 5. С. 660-666.
13. Пятыхин С.С., Оприлов В.А., Воденев В.А. Сигнальная роль потенциала действия у высших растений // Физиология растений. 2008. Т. 55, №2. С. 312-319.
14. Пятыхин С.С., Оприлов В.А., Половинкин А.В., Воденев В.А. О природе генерации потенциалов действия у высших растений // Доклады Академии наук. 1999. Т.366, №3. С. 404-407.
15. Ретивин В. Г., Оприлов В. А., Федупина С. Б. Преадаптация тканей стебля *Cucurbita pepo* к повреждающему действию низких температур индуцированная потенциалом действия // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 499-510.
16. Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Абрамова Н.Н., Лобов С.А., Федупина С.Б. Уровень АТФ во флоэмном эксудате стебля высшего растения после распространения электрических реакций на ожог и охлаждение // Вестник ННГУ. Серия биологическая. 1999б. №1. С. 124-131.
17. Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Лобов С.А., Тараканов С.А, Худяков В.А. Модификация устойчивости фотосинтезирующих клеток к охлаждению и

- прогреву после раздражения корней раствором KCl // Физиология растений. 1999а. Т. 46, №5. С. 790-798.
18. Сухов В.С., Неруш В.Н., Воденеев В.А. Исследование путей распространения потенциала действия у высших растений с использованием модели ФитцХью-Нагумо // Компьютерные исследования и моделирование. 2011. Т. 3, № 1. С. 77-84.
 19. Сухов В.С., Пятыгин С.С., Оприлов В.А., Крауз В.О. Влияние распространяющихся электрических сигналов на замедленную флуоресценцию листьев герани. II. Теоретический анализ // Биофизика. 2008. Т. 53, №4, С. 672-678.
 20. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
 21. Ainsworth E., Bush D. Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity // Plant Physiol. 2011. V. 155. P. 64-69.
 22. Allakhverdiev S., Kreslavski V., Klimov V., Los D., Carpentier R., Mohanty P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis // Photosynth Res. 2008. V.98. P. 541-550.
 23. Allakhverdiev S., Nishiyama Y., Takahashi S., Miyairi S., Suzuki I., Murata N. Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis* // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 263-273.
 24. Alte F., Stengel A., Benz J., Petersen E., Soll J., Groll M., Bolter B. Ferredoxin: NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner // Proc Natl Acad Sci USA. 2010. V. 107. P. 19260-19265.
 25. Benz J., Stengel A., Lintala M., Lee Y., Weber A., Philippart K., Gugel I., Kaieda S., Ikegami T., Mulo P., Soll J., Bolter B. Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise // Plant Cell. 2010. V. 21. P. 3965-3983.

26. Bishop P., Makus D., Pearce G., Ryan C. Proteinase inhibitor inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981. V. 78. P. 3536-3540.
27. Boens N., Qin W., Basaric N., Orte A., Talavera E. M., Alvarez-Pez J. M. Photophysics of the fluorescent pH indicator BCECF // *J Phys Chem A*. 2006. V. 110. P. 9334-9343.
28. Camoni L., Visconti S., Aducci P. The phytotoxin fusicoccin, a selective stabilizer of 14-3-3 interactions? // *IUBMB Life*. 2013. V. 65, № 6. P. 513-517.
29. Choi W.G., Hilleary R., Swanson S.J., Kim S.H., Gilroy S. Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants // *Annu Rev Plant Biol*. 2016. V. 67. P. 287-307.
30. Davies E. Electrical signals in plants: Facts and hypotheses // *Plant Electrophysiol*. 2006. P. 407-422
31. de Boer A.H., de Vries-van Leeuwen I.J. Fusicoccanes: diterpenes with surprising biological functions // *Trends Plant Sci*. 2012. V. 17, № 6. P. 360-368.
32. Degli Agosti R. Touch-induced action potentials in *Arabidopsis thaliana* // *Arch Des Sci*. 2014. V. 67. P. 125–138.
33. Dempsey D.A., Shah J., Klessig D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants // *Crit Rev Plant Sci*. 1999. V. 18. P. 547-575.
34. Dixon G.K., Brownlee C., Merrett M.J. Measurement of internal pH in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* using 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(and-6)carboxyfluorescein acetoxymethylester and digital imaging microscopy // *Planta*. 1989. V. 178 (4). P. 443-449.
35. Dziubinska H. Ways of signal transmission and physiological role of electrical potential in plants // *Acta Soc Bot Polon*. 2003. V. 72. P. 309–318.
36. Dziubinska H., Filek M., Koscielniak J., Trebacz K. Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of *Vicia faba* minor seedlings // *J Plant Physiol*. 2003. V. 160. P. 1203-1210.

37. Egorov S.Y., Krasnovsky A.A. Participation of chlorophyll triplet state and singlet molecular oxygen in chlorophyll photodestruction / In: Murata N. (ed.) Research in Photosynthesis. Proceedings of the IXth ICP. Kluwer Academic Press, Amsterdam, 1992. V. 3, pp. 111-114.
38. Farmer E., Ryan C. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves // Proc Natl Acad Sci USA. 1990. V. 87. P. 7713-7716.
39. Favre P., Degli Agosti R. Voltage-dependent action potentials in *Arabidopsis thaliana* // Physiol Plant. 2007. V. 131. P. 263-272.
40. Favre P., Greppin H., Degli Agosti R. Repetitive action potentials induced in *Arabidopsis thaliana* leaves by wounding and potassium chloride application // Plant Physiol. Biochem. 2001. V. 39. p. 961–969.
41. Felle H.H. pH: Signal and Messenger in Plant Cells // Plant Biology. 2001. V. 3. P. 577-591.
42. Felle H.H., Zimmermann M.R. Systemic signaling in barley through action potentials // Planta. 2007. V. 226. P. 203-214.
43. Filek M., Koscielniak J. The effect of wounding the roots by high temperature on the respiration rate of the shoot and propagation of electric signal in horse bean seedlings (*Vicia faba* L. minor) // Plant Sci. 1997. V. 123. P. 39-46.
44. Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Pena-Cortes H. Analysis of the transient increase in cytosolic Ca^{2+} during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca^{2+} transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 456-459.
45. Fromm J. Long-distance electrical signaling and physiological functions in higher plants / In: Volkov A.G. (ed.) Plant Electrophysiology. Theory and Methods. Berlin Heidelberg: Springer, 2006, pp 269–285.
46. Fromm J., Bauer T. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation // J Exp Bot. 1994. V. 45. P. 463-469.

47. Fromm J., Eshrich W. Electric signals released from roots of willow (*Salix viminalis* L.) change transpiration and photosynthesis // *J Plant Physiol.* 1993. V. 141. P. 673-680.
48. Fromm J., Hajirezaei M.R., Becker V.K., Lautner S. Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf // *Front Plant Sci.* 2013. V. 4. Article 239.
49. Fromm J., Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 249-257.
50. Furch A.C., van Bel A.J., Fricker M.D., Felle H.H., Fuchs M., Hafke J.B. Sieve element Ca^{2+} channels as relay stations between remote stimuli and sieve tube occlusion in *Vicia faba* // *The Plant Cell.* 2009. V. 21. P. 2118–2132.
51. Furch A.C., Zimmermann M.R., Will T., Hafke J.B., van Bel A.J. Remote-controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima* // *J Exp Bot.* 2010. V. 61. P. 3697-7308.
52. Galle A., Lautner S., Flexas J., Ribas-Carbo M., Hanson D., Roesgen J., Fromm J. Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO_2 // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 542-552.
53. Gradmann D. Models for oscillations in plants // *Aust J Plant Physiol.* 2001. V. 28. P. 577-590.
54. Grams T. E. E., Lautner S., Felle H. H., Matyssek R., Fromm J. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf // *Plant, Cell & Environment.* 2009. V. 32. P. 319-326.
55. Grams T.E.E., Koziol C., Lautner S., Matyssek R., Fromm J. Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 79-84.
56. Grignon C., Sentenac H. pH and ionic conditions in the apoplast // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1991. V. 42. P. 3-28.

57. Hedrich R., Salvador-Recatala V., Dreyer I. Electrical wiring and long-distance plant communication // *Trends in Plant Science*. 2016. V. 21 (5). P. 376-387.
58. Herde O. Pena-Cortes H., Wasternack C., Willmitzer L., Fisahn J. Electric signaling and pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants // *Plant Physiol*. 1999. V. 119. P. 213-218.
59. Herde O., Fuss H., Pena-Cortes H., Fisahn J. Proteinase inhibitor II gene expression induced by electrical stimulation and control of photosynthetic activity in tomato plants // *Plant Cell Physiol*. 1995. V. 36. P. 737-742.
60. Herde O., Pena-Cortes H., Willmitzer L., Fisahn J. Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants // *Plant Cell Environ*. 1997. V. 20. P. 136-141.
61. Hlavackova V., Krchnak P., Naus J., Novak O., Spundova M., Strnad M. Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning // *Planta*. 2006. V. 225. P. 235-244.
62. Hlavinka J., Nozkova-Hlavackova V., Flokova K., Novak O., Naus J. Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient sitiens mutants and sitiens pre-treated by ABA // *Plant Physiol Biochem*. 2012. V. 54. P. 89-96.
63. Hossain M.A., Bhattacharjee S., Armin S.M., Qian P., Xin W., Li H.Y., Burritt D.J., Fujita M., Tran L.S. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging // *Front Plant Sci*. 2015. V. 6. Article 420.
64. Huang W., Yang S.J., Zhang S.B., Zhang J.L., Cao K.F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection for the resurrection plant *Paraboea rufescens* under drought stress // *Planta*. 2012. V. 235. P. 819-828.
65. Huber A.E., Bauerle T.L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge // *J Exp Bot*. 2016. V. 67, № 7. P. 2063-2079.

66. Johnson B.R., Wyttenbach R.A., Wayne R., Hoy R.R. Action potentials in a giant algal cell: a comparative approach to mechanisms and evolution of excitability // *J Undergrad Neurosci Educ.* 2002. V. 1, № 1. A23-A27.
67. Johnson C.H., Shingles R., Ettinger W.F. Regulation and role of calcium fluxes in the chloroplast / In: Wise RR, Hooper JK (eds) *The structure and function of plastids.* Springer, Dordrecht, 2006, pp 403-416.
68. Julien J. L., Desbiez M. O., De Jaegher G., Frachisse J. M. Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa* L. // *Journal of Experimental Botany.* 1991. V. 42. P. 131-137.
69. Julien J. L., Frachisse J. M. Involvement of the proton pump and proton conductance change in the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa* // *Canadian Journal of Botany.* 1992. V. 70. P. 1451-1458.
70. Katicheva L., Sukhov V., Akinchits E., Vodeneev V. Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55 (8). P. 1511-1519.
71. Katicheva L., Sukhov V., Bushueva A., Vodeneev V. Evaluation of the open time of calcium channels at variation potential generation in wheat leaf cells // *Plant Signaling & Behavior.* 2015. V. 10 (3). Article e993231.
72. Kim K., Portis A.R. Jr. Oxygen-dependent H₂O₂ production by Rubisco // *FEBS Lett.* 2004. V. 571. P. 124-128.
73. Kisnieriene V., Lapeikaite I., Sevriukova O., Ruksenas O. The effects of Ni²⁺ on electrical signaling of *Nitellopsis obtusa* cells // *J Plant Res.* 2016. V. 129 (3). P. 551-558.
74. Klughammer C., Schreiber U. Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I // *PAM Application Notes.* 2008. V. 1. P. 11-14.
75. Koselski M., Trebacz K., Dziubinska H., Krol E. Light- and dark-induced action potentials in *Physcomitrella patens* // *Plant Signaling & Behavior.* 2008. V. 3 (1). P. 13-18.

76. Koziol C., Grams T.E.E., Schreiber U., Matyssek R., Fromm J. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals // *New Phytol.* 2004. V. 161. P. 715-722.
77. Kramer D.M., Sacksteder C.A., Cruz J.A. How acidic is the lumen? // *Photosynth Res.* 1999. V. 60. P. 151-163.
78. Krol E., Dziubinska H., Stolarz M., Trebacz K. Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula* // *Biol Plant.* 2006. V. 50 (3). P. 411-416.
79. Krol E., Dziubinska H., Trebacz K. Low-temperature-induced transmembrane potential changes in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus* and *Vicia faba* // *Physiologia Plantarum.* 2004. P. 120. P. 265-270.
80. Krupenina N.A., Bulychev A.A. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energydependent quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim Biophys Acta.* 2007. V. 1767. P. 781-788.
81. Kupisz K., Trebacz K. Effect of cold and menthol on membrane potential in plants // *Physiologia Plantarum.* 2011. V. 141. P. 352-360.
82. Lautner S., Grams T.E.E., Matyssek R., Fromm J. Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis // *Plant. Physiol.* 2005. V. 138. P. 2200-2209.
83. Lautner S., Stummer M., Matyssek R., Fromm J., Grams T.E.E. Involvement of respiratory processes in the transient knockout of net CO₂ uptake in *Mimosa pudica* upon heat stimulation // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 254-260.
84. Lee Y.-H., Tamura K., Maeda M., Hoshino M., Sakurai K., Takahashi S., Ikegami T., Hase T., Goto Y. Cores and pH-dependent dynamics of ferredoxin-NADP⁺ reductase revealed by hydrogen/deuterium exchange // *J Biol Chem.* 2007. V. 282, № 8. P. 5959-5967.
85. Leon J., Rojo E., Sanchez-Serrano J.J. Wound signalling in plants // *J Exp Bot.* 2001. V. 52. P. 1-9.

86. Lewis B.D., Karlin-Neumann G., Davis R. W., Spalding E. P. Ca^{2+} -Activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in arabidopsis seedlings // *Plant Physiology*. 1997. V. 114. P. 1327-1334.
87. Lovelli S., Scopa A., Perniola M., Di Tommaso T., Sofo A. Absciscic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants // *J Plant Physiol*. 2012. V. 169. P. 226-233.
88. Luu D.T., Maurel C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status // *Plant Cell Environ*. 2005. V. 28. P. 85-96.
89. Maffei E.M., Bossi S. Electrophysiology and plant responses to biotic stress / In: Volkov A. (ed.) *Plant electrophysiology. Theory and methods* . Berlin: Springer, 2006, pp 461-481.
90. Malone M. Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings // *Planta*. 1992. V. 187. P. 505-510.
91. Malone M. Rapid, long-distance signal transmission in higher plants / In: Callow J.A. (ed.) *Advances in Botanical Research*, 1996, pp 163-228.
92. Malone M. Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. // *New Phytol*. 1994. V. 128. P. 49-56.
93. Mancuso S. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera* // *Aust J Plant Physiol*. 1999. V. 26. P. 55-61.
94. Marre E. Fusicoccin: a tool in plant physiology // *Ann Rev Plant Physiol*. 1979. V. 30. P. 273-288.
95. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // *J Exp Bot*. 2000. V. 51. P. 659–668.
96. Meyer A.J., Weisenseel M.H. Wound-Induced changes of membrane voltage, endogenous currents, and ion fluxes in primary roots of maize // *Plant Physiol*. 1997. V. 114. P. 989-998.
97. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci*. 2011. V. 16. P. 300-309.

98. Miyake C., Miyata M., Shinzaki Y., Tomizawa K. CO₂ response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves-relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 629-637
99. Muhling K.H., Lauchli A. Light-induced pH and K⁺ changes in the apoplast of intact leaves // *Planta.* 2000. V. 212 (1). P. 9-15.
100. Muller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 1558-1566.
101. O'Donnell P.J., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H.M.O., Bowles D.J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants // *Science.* 1996. V. 274. P. 1914-1917.
102. Pavlovic A., Slovakova L., Pandolfi C., Mancuso S. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) // *J Exp Bot.* 2011. V. 62. P. 1991-2000.
103. Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins // *Science.* 1991. V. 253. P. 895-898.
104. Pena-Cortes H., Fisahn J., Willmitzer L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plant // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995. V. 92. P. 4106-4113.
105. Rhodes J. D., Thain J. F., Wildon D. C. Evidence for physically distinct systemic signalling pathways in the wounded tomato plant // *Annals of Botany.* 1999. V. 84. P. 109-116.
106. Ricca U. Soluzione di un problema di fisiologia: La propagazione di stimolo nella "Mimosa" // *Nuove Giornale Botanico Italiano.* 1916. V. 23. P. 51-170.
107. Roth A. Water transport in xylem conduits with ring thickenings // *Plant Cell Environ.* 1996. V. 19. P. 622-629.

108. Rousset M., de Roo M., Guennec J.-Y. L., Pichon O. Electrophysiological characterization of tomato hypocotyl putative action potentials induced by cotyledon heating // *Physiol Plant*. 2002. V. 115. P. 197-203.
109. Shepherd V.A., Beilby M.J., Al Khazaaly S.A.S., Shimmen T. Mechano-perception in Chara cells: the influence of salinity and calcium on touch-activated receptor potentials, action potentials and ion transport // *Plant, Cell and Environment*. 2008. V. 31. P. 1575-1591.
110. Sibaoka T. Rapid plant movements triggered by action potentials // *Bot Mag Tokyo*. 1991. V. 104. P. 73-95.
111. Sonoike K. Photoinhibition of photosystem I // *Physiol Plant*. 2011. V. 142. P. 56–64.
112. Stahlberg R., Cleland R., Volkenburgh E. Decrement and amplification of slow wave potentials during their propagation in *Helianthus annuus* L. shoots // *Planta*. 2005. V. 220. P. 550-558.
113. Stahlberg R., Cleland R., Volkenburgh E. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants / In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, 2006, pp 291-308.
114. Stahlberg R., Cosgrove D. Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L. // *Planta*. 1996. V. 200. P. 416-425.
115. Stahlberg R., Cosgrove D. Rapid alterations in growth rate and electrical potentials upon stem excision in pea seedlings // *Planta*. 1992. V. 187. P. 523-531.
116. Stahlberg R., Cosgrove D.J. The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls // *Plant Physiol*. 1997. V.113. P. 209-217.
117. Stankovic B., Davies E. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato // *FEBS Lett*. 1996. V. 390. P. 275-279.

118. Stankovic B., Witters D. L., Zawadzki T., Davies E. Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationships and distinguishing characteristics // *Physiol Plantarum*. 1998. V. 103. P. 51-58.
119. Stankovic B., Zawadzki T., Davies E. Characterization of the variation potential in sunflower // *Plant Physiol*. 1997. V. 115. P. 1083-1088.
120. Sukhov V., Surova L., Sherstneva O., Bushueva A., Vodeneev V. Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperatures in pea // *Functional Plant Biology*. 2015. V. 42. P. 727-736.
121. Sukhov V. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants // *Photosynth Res*. 2016. V. 130. P. 373-387
122. Sukhov V., Akinchits E., Katicheva L., Vodeneev V. Simulation of variation potential in higher plant cells // *J Membrane Biol*. 2013. V. 246 (4). P. 287-296.
123. Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. Simulation of action potential propagation in plants // *J Theor Biol*. 2011. V. 291. P. 47-55.
124. Sukhov V., Orlova L., Mysyagin S., Sinitsina J., Vodeneev V. Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium // *Planta*. 2012. V. 235. P. 703-712.
125. Sukhov V., Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V. Influence of variation potential on resistance of the photosynthetic machinery to heating in pea // *Physiologia Plantarum*. 2014. V. 152. P. 773–783.
126. Sukhov V., Vodeneev V. A mathematical model of action potential in cells of vascular plants // *J Membr Biol*. 2009. V. 232. P.59–67.
127. Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Katicheva L., Semina M., Sukhov V. Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves // *J Plant Physiol*. 2016. V. 202. P. 57-64.
128. Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Sukhov V. Variation potential propagation decreases heat-related damage of pea photosystem I by two different pathways // *Plant Signaling & Behavior*. 2016a. V. 11 (3). Article e1145334.

129. Tholen D., Zhu X.-G. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 90–105.
130. Tikhonov A.N. pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts // *Photosynth Res.* 2013. V. 116. P. 511-534.
131. Tikkanen M., Mekala N.R., Aro E.M. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage // *Biochim Biophys Acta.* 2014. V. 1837 (1). P. 210-215.
132. Trebacz K., Dziubinska H., Krol E. Electrical signals in long-distance communication in plants / In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2006, pp 277–290.
133. Trebacz K., Sievers A. Action potentials evoked by light in traps of *Dionaea muscipula* Ellis // *Plant Cell Physiol.* 1998. V. 39. P. 369–372.
134. Uchida A., Jagendorf A.T., Hibino T., Takabe T., Takabe T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice // *Plant Sci.* 2002. V. 163. P. 515–523.
135. Vodeneev V., Akinchits E., Sukhov V. Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation // *Plant Signaling & Behavior.* 2015. V. 10 (9). Article e1057365.
136. Vodeneev V., Orlova A., Morozova E., Orlova L., Akinchits E., Orlova O., Sukhov V. The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves // *J Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 949-954.
137. Vodeneev V.A., Pyatygin S.S., Opritov V.A. Reversible change of extracellular pH at the generation of mechano-induced electrical reaction in a stem of *Cucurbita pepo* // *Plant Signaling & Behavior.* 2007. V. 2 (4). P. 267-268.
138. Volkov A.G., Adesina T., Markin V.S., Jovanov E. Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing // *Plant Physiol.* 2008a. V. 146. P. 694-702.

139. Volkov A.G., Coopwood K.J., Markin V.S. Inhibition of the *Dionaea muscipula* Ellis trap closure by ion and water channels blockers and uncouplers // *Plant Sci.* 2008b. V. 175. P. 642-649.
140. Volkov A.G., Haack R.A. Insect-induced bioelectrochemical signals in potato plant // *Bioelectrochem Bioenerg.* 1995. V. 37 (1). P. 55-60.
141. Von Caemmerer S., Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves // *Planta.* 1981. V. 153. P. 376-387.
142. Vredenberg W., Pavlovic A. Chlorophyll a fluorescence induction (Kautsky curve) in a Venus flytrap (*Dionaea muscipula*) leaf after mechanical trigger hair irritation // *J Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 242-250.
143. Wacke M., Thiel G. Electrically triggered all-or-none Ca^{2+} -liberation during action potential in the giant alga *Chara* // *J Gen Physiol.* 2001. V. 118 (1). P. 11-22.
144. Werdan K., Heldt H.W., Milovancev M. The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO_2 fixation in the light and dark // *Biochim Biophys Acta.* 1975. V. 396 (2). P. 276-292.
145. Wolosiuk R.A., Ballicora M.A., Hagelin K. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation // *FASEB J.* 1993. V. 7. P. 622-637.
146. Zhang W.-H., Rengel Z., Kuo J. Determination of intracellular Ca^{2+} in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature // *The Plant Journal.* 1998. V. 15. P. 147-151.
147. Zhao D.J., Chen Y., Wang Z.Y., Xue L., Mao T.L., Liu Y.M., Wang Z.Y., Huang L. High-resolution non-contact measurement of the electrical activity of plants in situ using optical recording // *Sci Rep.* 2015. V. 5. Article 13425.
148. Zimmermann M.R., Felle H.H. Dissection of heat-induced systemic signals: superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities // *Planta.* 2009. V. 229. P. 539-547.

149. Zimmermann M.R., Maischak H., Mithofer A., Boland W., Felle H.H. System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding // *Plant Physiol.* 2009. V. 149. P. 1593–1600.
150. Zimmermann M.R., Mithofer A., Will T., Felle H.H., Furch A.C. Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification // *Plant Physiol.* 2016. V. 170 (4). P. 2407-2419.
151. Zimmermann U., Beckers F. Generation of action potentials in *Chara corallina* by turgor pressure changes // *Planta.* 1978. V. 138 (2). P. 173-179.
152. Zivcak M., Brestic M., Balatova Z., Drevenakova P., Olsovska K., Kalaji H.M., Yang X., Allakhverdiev S.I. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress // *Photosynth Res.* 2013. V. 117. P. 529-546.