

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

На правах рукописи

Сурова Любовь Михайловна

**ВЛИЯНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА УСТОЙЧИВОСТЬ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ГОРОХА ПОСЕВНОГО
(PISUM SATIVUM L.)**

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
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Стрессовые сигналы у растений	10
1.1.1. Гидравлические сигналы	13
1.1.2. Химические сигналы	14
1.1.3. Электрические сигналы	17
1.1.4. Взаимодействие различных типов сигналов	20
1.2. Влияние стрессовых сигналов на функциональное состояние растений	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Объект исследования	29
2.2. Методы исследования	29
2.2.1. Регистрация электрической активности у растений	29
2.2.2. Изучение фотосинтетической активности и транспирации	31
2.2.3. Изучение устойчивости фотосинтетического аппарата листа к прогреву	36
2.2.4. Ингибиторный анализ	37
2.2.5. Изучение устойчивости целого растения к прогреву	37
2.2.6. Оценка содержания АТФ в листьях гороха	38
2.2.7. Статистика	38
ГЛАВА 3. РОЛЬ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА В ИНДУКЦИИ ОТВЕТОВ ФОТОСИНТЕЗА И ТРАНСПИРАЦИИ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	39
3.1. Характеристика ВП, вызванного локальным ожогом у проростка гороха	39
3.2. Исследование влияния ВП на параметры фотосинтеза и транспирации у гороха	42
ГЛАВА 4. АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕЗ И ТРАНСПИРАЦИЮ	46
4.1. Анализ роли темновой стадии фотосинтеза в формировании вызванного вариабельным потенциалом фотосинтетического ответа	46

4.2. Влияние инактивации H^+ -АТФазы на транспирацию	49
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА К ДЕЙСТВИЮ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА	51
5.1. Влияние переменного потенциала на устойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом	51
5.2. Анализ роли вызванного ВП фотосинтетического ответа в повышении устойчивости фотосистемы I.....	58
5.3. Анализ роли вызванного ВП транспирационного ответа в повышении теплового повреждения фотосистемы II	61
Глава 6. АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИЗМЕНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА.....	65
6.1. Увеличение циклического потока электронов и рост нефотохимического тушения флуоресценции.....	65
6.2. Повреждение фотосистемы II как механизм защиты фотосистемы I	74
6.3. Увеличение содержания АТФ как потенциальный механизм восстановления фотосистемы II.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ВЫВОДЫ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

А – ассимиляция CO_2

АБК – абсцизовая кислота

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВП – переменный потенциал

ЖК – жасмоновая кислота

НАДФ⁺ – окисленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

ОВ – ортованадат натрия

ПД – потенциал действия

РП – раневой потенциал

СП – системный потенциал

$T_{\text{кюв}}$ – температура кюветы

$T_{\text{л}}$ – температура листа

ФСI – фотосистема I

ФСII – фотосистема II

ЭС – электрический сигнал

$\mathcal{E}_{\text{л}}$ – электрод, контактирующий с листом растения

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

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

ЭТЦ – фотосинтетическая цепь переноса электронов

$[\text{CO}_2]$ – концентрация углекислого газа

$E_{\text{м}}$ – внутриклеточный мембранный потенциал

$E_{\text{H}_2\text{O}}$ – транспирация

NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции

$\gamma(\text{ND})$ – квантовый выход потерь, связанных с донорной стороной фотосистемы I

$\gamma(\text{NA})$ – квантовый выход потерь, связанных с акцепторной стороной фотосистемы I

$\gamma(\text{PSI})$ – квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы I

$\gamma(\text{PSII})$ – квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Электрические сигналы (ЭС) играют важную роль в формировании быстрых и системных ответов растения на изменения окружающей среды (Оприлов и др., 1991; Оприлов, 1998; Fromm, Lautner, 2007). В частности, известно, что ЭС влияют на экспрессию ряда генов (Stankovic, Davies, 1996), синтез фитогормонов (Hlaváčková et al., 2006), процессы транспорта ассимилятов (Fromm, Bauer, 1994), дыхание (Pavlovič et al., 2011) и др. Существует большое число работ (Сухов и др., 2008а; Hlaváčková et al., 2006; Pavlovič et al., 2011; Peña-Cortés et al., 1995; Fromm, Fei, 1998; Krupenina, Bulychev, 2007; Krupenina et al., 2008; Grams et al., 2009), посвященных влиянию потенциала действия (ПД) и переменного потенциала (ВП) на фотосинтез, результаты которых являются, тем не менее, достаточно противоречивыми. Так у многих растений показано, что ЭС вызывают быструю инактивацию фотосинтеза, продолжающуюся 5-15 минут. (Сухов и др., 2008а; Pavlovič et al., 2011; Krupenina, Bulychev, 2007; Krupenina et al., 2008; Grams et al., 2009). На более длительных временах может развиваться медленная инактивация фотосинтеза, которая достигает максимума через 30-40 минут после индукции ЭС (Hlaváčková et al., 2006; Sukhov, 2016). Кроме того у отдельных видов растений показано развитие активации фотосинтеза, которая достигает максимума через 20 минут после индукции сигнала (Fromm, Fei, 1998). Последовательное развитие нескольких типов фотосинтетического ответа также может наблюдаться у некоторых растений; в частности, у томатов механическая стимуляция и вызванные ею сигналы вызывают сначала быструю, а потом медленную инактивацию фотосинтеза, а локальный нагрев и связанный с ним сигнал – активацию фотосинтеза и последующую медленную инактивацию (Peña-Cortés et al., 1995).

Дискуссионными остаются и механизмы развития фотосинтетических ответов. В случае вызванной ЭС быстрой инактивации фотосинтеза существуют две основные гипотезы, объясняющие ее развитие. Первая гипотеза (Krupenina, Bulychev, 2007; Krupenina et al., 2008) предполагает, что начальной стадией фотосинтетического ответа является вход Ca^{2+} в цитозоль и строму, который приводит к инактивации цикла Кальвина и дальнейшему развитию изменений протекания процессов световой стадии. В рамках другой (Grams et al., 2009) в качестве механизма, запускающего

фотосинтетический ответ, рассматривается закисление цитоплазмы и стромы, которое также приводит к снижению активности темновой стадии фотосинтеза. Обе гипотезы предполагают, что именно инактивация цикла Кальвина является начальным этапом формирования фотосинтетического ответа. Существуют отдельные работы (Pavlovič et al., 2011), показывающие, что развитие вызванных ПД ответов фотосинтеза существенно зависит от изменений в протекании темновой стадии. В то же время, остаются открытыми вопросы об универсальности такого механизма влияния ЭС на фотосинтез, а также о возможности развития не связанных с изменениями работы цикла Кальвина ответов фотосинтеза.

Остаётся невыясненной и конечная роль вызванных электрическими сигналами функциональных ответов растения. Существует предположение, что все электрические сигнал-индуцированные функциональные изменения способствуют повышению устойчивости растений к стрессовым воздействиям (Ретивин и др., 1997, 1999). Согласно Ретивину и соавторам (1997), быстрое и кратковременное повышение устойчивости растений к стрессовым факторам (10-25 мин после стимуляции) является конечным результатом индуцированных электрическими сигналами функциональных изменений. Так, было показано, что ПД у проростков тыквы (*Curcubita pepo* L.) может увеличить устойчивость целого растения к охлаждению (Ретивин и др., 1997), и устойчивость фотосистемы II (ФСII) к охлаждению и нагреву (Ретивин и др., 1999), но механизмы этого ответа не были полностью изучены. Увеличение устойчивости не подвергавшихся раздражению частей растения способствует его выживанию при системном действии стрессора, которое может последовать после индукции электрического сигнала (Ретивин и др., 1997). Мы предполагаем, что снижение повреждения фотосинтетического аппарата может быть механизмом, способствующим влиянию электрических сигналов на устойчивость растений к стрессовым факторам.

Таким образом, исследование механизмов влияния вызванных локальными стимулами ЭС на фотосинтетические процессы и их устойчивость к действию стрессоров позволит раскрыть механизмы формирования адаптивного функционального ответа растения при действии неблагоприятных факторов и будет способствовать пониманию механизмов их выживания в меняющихся условиях внешней среды

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы стал анализ путей влияния переменного потенциала на устойчивость фотосинтетического аппарата проростков гороха к действию высокотемпературного стресса.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ механизмов развития вызванных переменным потенциалом изменений активности фотосинтеза и транспирации.
2. Изучение влияния переменного потенциала на устойчивость фотосинтеза к негативному действию высокотемпературного стресса.
3. Анализ потенциальных механизмов индуцированного переменным потенциалом повышения устойчивости фотосинтетического аппарата к действию высокотемпературного стресса.
4. Изучение влияния переменного потенциала на содержание АТФ в неповреждённых листьях гороха и анализ механизмов такого влияния.
5. Оценка влияния переменного потенциала на устойчивость к действию высокотемпературного стресса на уровне целого растения.

Научная новизна работы

Переменный потенциал влияет на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию высокотемпературного стресса, увеличивая устойчивость фотосистемы I.

Пути индуцированного ВП изменения устойчивости фотосистемы I могут являться рост нефотохимического тушения флуоресценции, увеличение циклического потока электронов, инактивация фотосистемы II.

Переменный потенциал вызывает повышение содержания АТФ в неповреждённых листьях, которое связано с ответами фотосинтеза и дыхания.

Научно-практическая значимость работы

Результаты проведённых исследований вносят большой вклад в понимание влияния переменного потенциала на фотосинтез и транспирацию, показывая, в частности, его участие в регуляции устойчивости фотосинтетического аппарата к действию неблагоприятных факторов у высших растений.

Предложена схема возможных путей изменения устойчивости

фотосинтетического аппарата при генерации ЭС, способствующего росту устойчивости растения в целом. Это может служить основой для разработки методов повышения устойчивости сельскохозяйственных культур.

Результаты и выводы работы могут быть использованы в учебном процессе при разработке и модификации общих и специальных курсов в области биофизики и физиологии растений.

Собственный вклад автора в исследования

На всех этапах выполнения работы автор принимал личное участие в её проведении, включая подготовку и выполнение экспериментальных исследований, освоение новых методов измерения с помощью современного оборудования, сбор и обработку полученных результатов, их анализ и обсуждение, а также участие совместно с соавторами в написании научных статей и представление результатов исследования на всероссийских и международных научных конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Вариабельный потенциал вызывает изменение устойчивости фотосинтетического аппарата к действию высокотемпературного стресса, которое обусловлено развитием вызванных вариабельным потенциалом ответов фотосинтеза и транспирации.

2. Механизмами повышения устойчивости фотосистемы I могут являться рост нефотохимического тушения флуоресценции, увеличение циклического потока электронов, инкативация фотосистемы II.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 7 международных и всероссийских конференциях в том числе: Международной Пущинской конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пущино, 2014); Международной конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пущино, 2014); Годичном собрании Общества физиологов растений и Международной научной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и

фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); VIII Съезд ОФР России Всероссийской научная конференция с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); Международной конференции «Photosynthesis Research for Sustainability – 2016: in honor of Nathan Nelson and T. Nejat Veziroglu» (Пушино, 2016); IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2016).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 5 – статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-26-00098 «Роль электрогенеза в повышении устойчивости и увеличении продуктивности сельскохозяйственных растений при их обработке фитогормонами») и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 14-04-01899А «Влияние электрических сигналов на энергетический статус растений: феноменология и анализ механизмов», № 13-04-97152 р_поволжье_а «Феноменологический анализ информационной роли электрических сигналов у высших растений»).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста и содержит 26 рисунков, 3 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы по исследуемой тематике, описания применяемых методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 288 источников, из них 262 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стрессовые сигналы у растений

Растения, как любые живые организмы, регулярно подвергаются влиянию большого количества абиотических и биотических стрессоров. В меняющихся условиях окружающей среды и по причине неподвижного образа жизни для выживания растений им необходимо достаточно быстрое распознавание внешних стимулов. На сегодняшний день накоплено много информации относительно стрессовых (защитных) реакций растений при воздействии одиночного стрессора (Mohr, Cahill, 2003; Wang et al., 2003; Choi et al., 2014; Torres-Ruiz et al., 2015), тем не менее, в естественных условиях растения чаще сталкиваются с сочетанием нескольких стресс-факторов. Комбинации стрессоров могут приводить к возникновению специфических сигнальных каскадов и уникальным реакциям растений (Hewezi et al., 2008). Анализ данной проблемы может стать основанием для получения более реалистичного представления о существовании растений в естественных условиях (Huber, Bauerle, 2016).

Влияние стресс-факторов на жизнь растения часто ведёт к снижению продуктивности или ослабляет механизмы его защиты (Ewers, Fisher, 1989; Wang et al., 2001). Постоянная активация защитных механизмов и сигнальных путей растения привела бы к увеличению его устойчивости (Zebelo, Maffei, 2015), но ввиду «затратности» таких механизмов эволюция создала высокоэффективную систему реагирования, которая быстро активируется в ответ на стресс-факторы. Одним из путей оптимизации защитного ответа растения является передача стрессовых сигналов на большие расстояния, что позволяет ему быстро справляться с соответствующим стрессором путём формирования физиологических изменений на уровне целого организма при локальном действии стресс-факторов.

Стрессовые сигналы растений условно можно разделить на три основных типа: (I) гидравлический (Malone, 1992; Vodeneev et al., 2015), (II) химический (Шакирова, 2001; Javid et al., 2011; Wang, Song, 2008; Foyer, Noctor, 2009; Mittler et al., 2011; Креславский и др., 2012; Sewelam et al., 2016) и (III) электрический (Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015; Sukhov, 2016). Они различаются между собой не только по своей природе, но и по скорости распространения (табл. 1). Регуляция и тонкая настройка этих сигналов, их специфичность, перекрёстные пути их действия в ответ на различные стрессоры пока недостаточно изучены.

Рассмотрим их более подробно.

Таблица 1

Тип сигнала	Действие	Скорость распространения	Вид растения	Ссылка
Гидравлический	Изменения клеточного тургора при водном стрессе	<0,03 см/с	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	Christmann et al. (2007)
	Изменения толщины листа при повреждении	10 см/с	<i>Triticum durum</i> (Desf.)	Malone (1992)
		20 см/с	<i>Prunus avium</i> (L.), <i>Tilia cordata</i> (Mill.), <i>Solanum lycopersicum</i> (L.), <i>Zea mays</i> (L.)	Boari, Malone (1993)
	Волна давления при механическом сгибании	Одновременно со сгибанием	<i>Arpinus betulus</i> (L.), <i>Ilex aquifolium</i> (L.), <i>Pinus sylvestris</i> (L.), <i>Cupressus sempervirens</i> (L.), <i>Taxus baccata</i> (L.)	Lopez et al. (2014)
	Теоретическое распространение волны давления	150 000 см/с	Любой вид растения	Malone (1993)
Скорость перемещения сока	Ксилемный поток	0,7 см/с	<i>Triticum aestivum</i> (L.)	Fisher (1990)
	Поток по флоэме	25 см/с	<i>Triticum aestivum</i> (L.)	Passioura (1972)
Химический	Кальциевые волны при солевом стрессе	~0,04 см/с	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	Choi et al. (2014)
	Транспорт растворённого вещества	0,7 см/с	<i>Zea mays</i> (L.)	Boari, Malone (1993)
	Возрастание ЖК после повреждения	0,05 см/с	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	Glauser et al. (2008 a)
	Возрастание содержания АФК в апопласте при повреждении,	0,14 см/с	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	Miller et al. (2009)

	нагреве, охлаждении, большой интенсивности света, солевом стрессе			
Электрический	ПД при электрической стимуляции	0,4 см/с	<i>Drosera rotundifolia</i> (L.)	Pickard (1973)
	ПД при электрической стимуляции	0,03- 0,12 см/с	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	Favre, Degli Agosti (2007)
	ПД при электрической стимуляции	0,05-0,15 см/с	<i>Conocephalum conicum</i> (L.)	Trebacz et al. (1994)
	ПД при нагревании	10,5 см/с	<i>Glycine max</i> (L.)	Lang, Volkov (2008)
	ПД при холодном шоке и прикосновении	2-3 см/с	<i>Mimosa pudica</i> (L.)	Fromm, Lautner (2007)
	ПД при захлопывании ловушки листа	20 см/с	<i>Dionaea muscipula</i> (Ellis.)	Sanderson (1888)
	ПД при действии разобшителя карбонилцианид-4- (трифторметокси) фенилгидразон (FCCP)	До 4000 см/с	<i>Glycine max</i> (L.)	Volkov (2000)
	ВП при отрезании	0,5-0,6 см/с	<i>Mimosa pudica</i> (L.)	Fromm, Lautner (2007)
		1-2 см/с	Большинство растений	Fromm (2006)
	ВП, следующий за гидравлическим сигналом (положительные скачки давления)	0,08-0,5 см/с	<i>Cucumis sativus</i> (L.)	Stahlberg , Cosgrove (1997a)
	ВП при ожоге	10 см/с	<i>Triticum durum</i> (Desf.)	Malone (1992)
		0,1-0,2 см/с	<i>Populus trichocarpa</i> (L.) <i>Populus tremula</i> (L.)	Lautner et al. (2005)

		От 0,4 см/с на расстоянии 3 см от места ожога до 0,07 см/с на расстоянии 15 см от места ожога	<i>Triticum aestivum</i> (L.)	Vodeneev et al. (2012)
		0,08 ± 0,02 см/с	<i>Pelargonium zonale</i> (L.)	Sukhov et al. (2012)
		0,4 ± 0,1 см/с	<i>Cucurbita pepo</i> (L.)	Сухов и др. (2013)
		0,3-0,5 см/с	<i>Zea mays</i> (L.)	Grams et al. (2009)
		0,09 ± 0,02 см/с	<i>Pisum sativum</i> (L.)	Sukhov et al. (2014)
	СП при повреждении	0,08-0,2 см/с	<i>Vicia faba</i> (L.), <i>Hordeum vulgare</i> (L.)	Zimmermann et al. (2009)

1.1.1. Гидравлические сигналы

Вода для растения является связующей средой между его частями, с её помощью осуществляется обмен питательных веществ и поддержание процессов метаболизма, что делает воду оптимальной средой для быстрого обмена информацией. Вода в растениях транспортируется под давлением по пути «почва-растение-воздух» (Zimmermann, 1983), и по этому пути через всё растение может передаваться сигнал об изменениях в окружающей среде (Huber, Bauerle, 2016).

Гидравлические сигналы ежедневно управляют физиологическими функциями растения посредством регуляции объёма живых клеток (Westgate, Boyer, 1984; Tang, Boyer, 2002, 2003), который находится под контролем тургора клетки (Taiz, 1984) и колеблется с уменьшением почвенного водного статуса, увеличением испарения (Bouchabke et al., 2006)) или под действием листогрызущих насекомых (Alarcon, Malone, 1994).

При повреждении тканей растения создаётся волна давления - гидравлический сигнал (Mancuso, 1999; Stahlberg et al., 2006). Эти изменения давления происходят в сосудах ксилемы и из-за низкого аксиального сопротивления могут быстро распространяться в окружающие клетки (Bramley et al., 2007) и, потенциально, по всему растению (Mancuso, 1999; Stahlberg et al., 2006). Однако изменение давления не может восприниматься мертвыми клетками, такими как сосуды ксилемы и, следовательно, должны быть расшифрованы смежными клетками паренхимы. Кроме того, клетки

паренхимы могут воспринимать и проводить изменения давления (изменения тургора) сами с помощью эластичной и упругой клеточной стенки (Tyree, Yang, 1990). Вполне вероятно, что клетки паренхимы также способны переводить гидравлические сигналы в физиологический ответ с помощью механочувствительных каналов в плазматической мембране (Arnadottir, Chalfie, 2010; Christmann et al., 2013).

Ксилемное давление также может увеличиваться (импульсы давления) либо за счет расширения воды в сосудистой ткани (путём нагревания или при ожоге листьев (Stahlberg, Cosgrove, 1997a)), либо перемещением воды при механическом сгибании ветром или искусственным путём (Lopez et al., 2014). Засуха также может влиять на тургорное давление клеток путём перемещения воды в окружающие ткани или создавать импульсы давления в ксилеме (импульс давления движется быстрее, чем жидкость), спровоцированные кавитацией или повреждением сосудистых пучков (Bramley et al., 2007; Vandeleur et al., 2014).

Тем не менее этот механизм не очень хорошо изучен, и в настоящее время существует больше гипотез, чем подтверждённых данных. Высокая корреляция была получена между кавитацией и началом закрытия устьиц в периоды засухи (Cochard et al., 1996; Salleo et al., 2001), но остается неясным, импульсы возрастающего давления или вытеснение воды инициирует закрытие устьиц во время прогрессивного увеличения давления ксилемы. Гидравлические импульсы также могут помочь объяснить снижение устьичной проводимости в некоторых растениях во время засухи, независимо от тургора листьев (Gollan et al., 1986) или водного потенциала листа (Gowing et al., 1990; Davies, Zhang, 1991). Однако сложность путей передачи сигнала предполагает дальнейшие исследования по расшифровке механизма, используемого растениями для декодирования гидравлических сигналов (Christmann et al., 2013).

1.1.2. Химические сигналы

Химические сигналы у растений являются наиболее часто обсуждаемыми в литературе, что подчеркивает их важность в вопросе воздействия стресса на растения. К химическим сигналам у растений чаще всего относят $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ /анионный сигнал, митоген-активируемые протеинкиназы, инозитол трифосфат, летучие вещества, гормональные сигналы и АФК-сигналы (Huber, Bauerle, 2016). Наиболее интересными с

точки зрения дистантной передачи у растений являются гормональные сигналы, летучие вещества и АФК-сигналы.

Гормональные сигналы связаны с изменением концентрации различных фитогормонов и в силу этого очень разнообразны. В числе наиболее значимых изменений гормонального статуса, вызванных неблагоприятными факторами, можно отметить (Kotak et al., 2007; Wilkinson et al., 2012) снижение ауксинов и гибберелинов и накопление жасмоновой и абсцизовой (АБК) кислот при засухе, возрастание содержания АБК и этилена при повышенных температурах, накопление АБК и жасмоновой кислоты в листьях при пониженных температурах и др. Действие фитогормонов на растительный организм является достаточно специфичным.

По-прежнему остаётся открытым вопрос, являются ли химические вещества стрессовым сигналом, передающимся исключительно на короткие расстояния, или способны действовать дистантно (Huber, Bauerle, 2016). Доказательства против их способности к дальней передаче приводятся в нескольких экспериментах, показывающих, что наиболее важные растительные гормоны для стресс/защитных реакций растений не способны перемещаться на большие расстояния и имеют скорости распространения, которые медленнее по сравнению с гидравлическим и/или электрическим сигналами (см. табл. 1). Однако в литературе имеются данные о дистантном действии гормональных сигналов при локальном раздражении и их влиянии на фотосинтез в отдалённых частях растения (Peña-Cortés et al., 1995, Hlaváčková et al. 2006; Hlavinka et al. 2012).

Летучие вещества также широко обсуждаются в литературе как системный дальний сигнал внутри и между растениями в ответ на действия травоядных насекомых или атаку патогенов. В воздушном пространстве листа коэффициент диффузии летучих соединений может быть на три-четыре порядка больше, нежели коэффициент молекулярной диффузии в водных растворах. В работе Stahlberg et al. (2001) приводятся данные о диффузии CO_2 по воздушному пространству листа и показано распространение сигнала деполяризации при снижении концентрации летучего соединения в апопласте. Летучие соединения могут вызвать системные защитные реакции в отдалённых частях растений, которые лишены сосудов (Frost et al., 2007) в течение нескольких часов (Howe, Jander, 2008) после атаки насекомых, и, следовательно, являются хорошим механизмом дальней сигнализации. Их химическое разнообразие,

образ действия, а также их роль в защите растений хорошо представлены в нескольких обзорах (Kessler, Baldwin, 2001, 2002; Dudareva et al., 2006; Howe, Jander, 2008; Zimmermann et al., 2009; Arimura et al., 2011; Wortemann et al., 2011; Mithofer, Boland, 2012).

АФК-сигналы связаны с генерацией и распространением активных форм кислорода (Wang, Song, 2008; Foyer, Noctor, 2009; Mittler et al., 2011; Sewelam et al., 2016), в первую очередь – с пероксидом водорода, который является долгоживущей формой АФК. АФК были недавно идентифицированы как возможные самораспространяющиеся химические сигналы, подходящие для передачи на большие расстояния, с помощью которых сигнал перемещается от клетки к клетке (Miller et al., 2009; Mittler et al., 2011). Их относительно быстрая скорость распространения, способность распространяться по всему растению из места образования (корень, стебель или лист) (Miller et al., 2009) и их потенциальная взаимосвязь с другими сигнальными путями (электрическими, кальциевыми волнами, растительными гормонами и гидравлическими волнами (Mittler, Blumwald, 2015) делают их подходящими коммуникаторами при биотическом или абиотическом стрессе.

Продукция АФК связана с функционированием электрон-транспортных цепей хлоропластов, митохондрий и пероксисом (Foyer, Noctor, 2009), с активностью апопластных пероксидаз (Minibayeva et al., 2009). Механизм сигнализации АФК в основном базируется на балансе между производством и утилизацией, которые одновременно происходят в растениях для поддержания определённой межклеточной концентрации.

Показано, что образование АФК может возникать под воздействием большого числа неблагоприятных факторов (Креславский и др., 2012; Neill et al., 2002; Apel, Hirt, 2004; Petrov, Van Breusegem, 2012). Дальнейшая передача АФК-сигнала связана в значительной степени с редокс-чувствительными белками, которые способны обратимо окисляться и восстанавливаться, выступая за счет этого индуктором редокс-изменений клетки (Foyer, Noctor, 2009), которые, в свою очередь, влияют на экспрессию генов и другие клеточные процессы. Несмотря на исследования, демонстрирующие пригодность АФК в качестве сигнальных молекул, есть ещё много нерешенных вопросов относительно специфичности, транспорта и механизмов восприятия сигнала (Mittler et al., 2011).

1.1.3. Электрические сигналы

Электрические сигналы в растениях – это быстро распространяющиеся электрические импульсы в ответ на различные раздражители (Maffei, Bossi, 2006; Fromm, Lautner 2007; Gallé et al. 2015; Vodeneev et al. 2015). Они были впервые зарегистрированы у венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*) (Haberland, 1890) и мимозы стыдливой (*Mimosa pudica*) (Applewhite, 1972), так называемых «локомоторных» растений. Долгое время считалось, что электрические сигналы не могут возникать у обычных «нелокомоторных» растений, у которых нет активных движений в ответ на стимул (Stahlberg et al., 2006). В настоящее время установлено участие электрических сигналов в качестве дистантных для многих видов растений.

В целом различают четыре вида электрических сигналов: потенциал действия (ПД), вариабельный потенциал (ВП), называемый также медленной волной, раневой потенциал (РП) и системный потенциал (СП).

ПД у растений представляет собой электрическую реакцию (от секунд до десятков секунд), характеризующуюся быстрой фазой деполяризации мембранного потенциала (снижение разности электрических потенциалов) с последующей быстрой фазой реполяризации (восстановление разности потенциалов) плазматической мембраны (Stankovic et al., 1998; Shvetsova et al., 2002; Volkov et al., 2004; Trebacz et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Davies, Stankovic, 2006; Trebacz et al., 2006; Beilby, 2007). ПД индуцируется под действием неповреждающих факторов (Trebacz et al., 2006), в частности, он может индуцироваться электрическим стимулом (Крупенина, 2010; Król et al., 2006; Булычев, Sevriukova et al., 2014; Kisnieriene et al., 2016), холодовым шоком (Оприлов и др., 2005; Fromm, Bauer 1994; Król et al., 2006), касанием (Sibaoka, 1991; Shepherd et al., 2008; Degli Agosti, 2014), химическими агентами (Felle, Zimmermann, 2007) и изменениями светового режима (Trebacz, Sievers 1998; Pikulenko, Bulychев, 2005).

Все раздражители, запускающие ПД, должны соответствовать критической интенсивности для того, чтобы достичь пороговых значений потенциала для запуска ПД. Как только порог достигнут, по принципу «всё или ничего», возникает электрический сигнал с постоянной амплитудой и скоростью, самораспространяющийся (Trebacz et al., 2006; Król et al., 2010; Sukhov et al., 2011) через плазмодесмы соседних клеток паренхимы сосудистых пучков (Оприлов и др., 1991; Sukhov et al., 2011) или по

симпласту ситовидных элементов флоэмы (Trebacz et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Zhao et al., 2015). ПД распространяется только по живым тканям, со скоростью 0,1–10,0 см/с у разных видов растений (Fromm, 2006; Volkov et al., 2000; Sibaoka, 1991; Trebacz et al., 2006; Beilby, 2007; Favre, Degli Agosti, 2007; Lang, Volkov, 2008; Zimmermann et al., 2009; Favre et al., 2011).

Генерация ПД связана с изменением активности ионных каналов (Beilby, 1982, 1984, 2007; Trebacz et al., 2006; Felle, Zimmermann, 2007; Sukhov, Vodeneev, 2009) и инактивацией H^+ -АТФазы плазматической мембраны (Воденев и др., 2006; Sukhov, Vodeneev, 2009). Фаза деполяризации обусловлена открытием потенциал зависимых Ca^{2+} каналов, которые высвобождают кальций из внутренних (митохондрии, вакуоль и эндоплазматический ретикулум) и внешних (апопласт) хранилищ в цитоплазму (Reddy et al., 2011), а также инактивацией H^+ -АТФазы (Воденев и др., 2006; Sukhov, Vodeneev, 2009). В ответ на приток кальция, Cl^- -каналы открываются и ионы Cl^- диффундируют по электрохимическому градиенту из клетки (Lunevsky et al., 1983) до активации потенциал зависимых K^+ -каналов, возникновению оттока K^+ (Trebacz et al., 2006), и реактивации H^+ -АТФазы на фазе реполяризации.

ВП – это длительная (десятки минут) электрическая реакция, характеризующаяся быстрой начальной фазой деполяризации и последующей длительной и разнообразной по форме фазой реполяризации по сравнению с ПД. На фоне ВП могут возникать «ПД-образные» спайки (Vodeneev et al., 2015). ВП в основном возникают в ответ на абиотические и биотические повреждающие стимулы, такие как механическое повреждение, ожог ткани или атака травоядного насекомого (Stankovic et al., 1998; Maffei, Bossi, 2006; Gallé et al., 2015; Vodeneev et al., 2015). ВП отличается от ПД тем, что распространяется по ксилеме (Vodeneev et al., 2015) и, следовательно, может передаваться через мертвую или неактивную ткань (Stahlberg, Cosgrove, 1996; Fromm, Lautner, 2007). Этот сигнал не подчиняется правилу «все или ничего», амплитуда ВП пропорциональна интенсивности повреждающего стимула (Vodeneev et al., 2015), скорость распространения непостоянна (Vodeneev et al., 2012; Sukhov et al., 2012, 2014a;) и уменьшается на 2,5% на см (Stahlberg et al., 2005) по мере прохождения ВП и удаления сигнала от места стимуляции (Oyarce, Gurovich, 2011; Vodeneev et al., 2012, 2015). Выявленная вариативность ВП и зависимость его параметров от вызывающего сигнал повреждения (Stahlberg et al., 2006), потенциально, позволяет передать существенно

большую информацию о типе стрессора и степени повреждения по сравнению с ПД, которые подчиняется закону «все или ничего» и, по-видимому, сигнализирует лишь о самом факте неблагоприятного воздействия.

Важно отметить, что ВП не самоподдерживающаяся реакция и в настоящее время рассматривается как локальный электрический ответ на распространение гидравлического сигнала (Mancuso, 1999; Stahlberg et al., 2006; Stahlberg, Cosgrove, 1996, 1997b), химического вещества (Vodeneev et al., 2015) или комплексного сигнала (Malone, 1994; Vodeneev et al., 2012).

ВП всегда предшествует положительное изменение гидравлического давления (Stahlberg, Cosgrove, 1996, 1997b), что стало основой гипотезы о гидравлической природе механизма распространения переменного потенциала. Взаимосвязь между гидравлическим сигналом и ВП была продемонстрирована на горохе (*Pisum sativum*): при раздражении наблюдалось увеличение давления и следующего за ним ВП, причём в зависимости от приложенного давления ВП мог задерживаться (Stahlberg, Cosgrove, 1997b), а также переменный потенциал переставал возникать при погружении эпикотилия гороха под воду (Mancuso, 1999).

Альтернативная гипотеза распространения ВП – локальное повреждение вызывает распространение по растению специфического раневого вещества, которое инициирует электрический ответ (Vodeneev et al., 2015). Раневое вещество может представлять собой олигосахариды разрушенных клеток (Bishop et al., 1981), H_2O_2 (Vodeneev et al., 2015), или гормоны: системин (Pearce et al., 1991; Peña-Cortés et al., 1995), жасмонат (Farmer, Ryan, 1990; Hlavinka et al., 2012), этилен (O'Donnell et al., 1996), абсцизовая кислота (Leon et al., 2001).

Кроме того, существует две комбинированные гипотезы: (1) индуцированное повреждением возрастание давления приводит к распространению водного потока, транспортирующего раневое вещество (Malone, 1994) и (2) изменение давления стимулирует турбулентную диффузию раневого вещества (Vodeneev et al., 2012, 2015; Sukhov et al., 2013).

Механизм генерации ВП в основном связан с переходной инактивацией H^+ -насоса (Julien et al., 1991; Stahlberg et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Vodeneev et al., 2015), благодаря чему медленная фаза реполяризации может длиться до 30-40 мин, однако активация Ca^{2+} , Cl^- и K^+ -каналов, как и при ПД, также сопровождает возникновение ВП

(Воденев и др., 2011; Vodeneev et al., 2015; Sukhov et al., 2013; Katicheva et al. 2014, 2015; Zhao et al., 2014).

РП (раневогой потенциал) подобен ВП по ионному механизму индукции фазы деполяризации и реполяризации, что проявляется в аналогичной форме сигнала (Stahlberg et al., 2006). Очевидно, что его название происходит от стрессора (ранение), обычно инициирующего такой тип изменения потенциала. Сигнал распространяется путём изменения клеточного тургора, вызывающего деполяризацию плазматической мембраны (Shimmen, 2001). Таким образом, РП, как и ВП, не является самоподдерживающейся реакцией (Zebelo, Maffei, 2012) и всегда следует за изменением давления. Тем не менее, в отличие от ВП, остается неясным, следует ли РП рассматривать в качестве дистантных сигналов, поскольку на сегодняшний день они были зарегистрированы только вблизи поврежденных клеток (1,0-40,0 мм от поврежденной или мертвой клетки) (Stahlberg, Cosgrove, 1994).

СП (системный потенциал) был предложен как четвёртый тип электрического потенциала (Zimmermann et al., 2009), который распространяется по апопласту при повреждении. СП является самораспространяющейся гиперполяризацией (возрастание разности электрических потенциалов на плазматической мембране), со скоростью распространения 0,9–1,7 мм/с и связан с активацией H^+ -АТФазы (Zimmermann et al. 2009). В то время как ПД, ВП и РП вызваны потоком кальция через плазматическую мембрану, сигналы СП инициируются активацией H^+ -насоса (потоки K^+ , Cl^- , и Ca^{2+} инициируются через СП). Преимущество самораспространяющихся СП в том, что они не следуют правилу «все или ничего». Таким образом, интенсивность СП может модулироваться, чтобы донести информацию о степени повреждения (Zimmermann et al., 2009). В ряде работ продемонстрировано распространение транзиторной гиперполяризации после различных стимулов (Fromm, Eshrich, 1993; Lautner et al., 2005; Zimmermann et al., 2009; Fromm et al., 2013), однако механизмы индукции СП не изучены. Существует гипотеза, что СП связан с распространением H_2O_2 (Suzuki, Mittler, 2012), но это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

1.1.4. Взаимодействие различных типов сигналов

Еще одним ключевым вопросом является взаимодействие сигналов различной природы. Физиологические реакции растений на стрессовые факторы требуют быстрой

передачи информации между удаленными органами растений. В то же время механизмы декодирования всех трех типов рассмотренных выше сигналов, их координирования и активации для защиты изучены не до конца. Какой тип сигнала передаёт первичную информацию о стрессовом воздействии пока не определено из-за расхождений в скорости передачи сигналов на большие расстояния и из-за относительно небольшого числа экспериментов, в которых имеются измерения всех трёх основных путей передачи сигналов одновременно.

Гидравлические и электрические сигналы в силу их быстрого распространения на дальние расстояния подходят для быстрого ответа растения на кратковременные возмущения (Christmann et al., 2013; Gallé et al., 2015).

Химические сигналы часто считаются самыми медленными дистантными сигналами у растений (Baydoun, Fry, 1985), и поэтому они не выступают в качестве основного механизма дальней сигнализации. Однако их дальнейшее исследование является перспективным, потому что в зависимости от путей транспорта (по ксилеме или по флоэме) скорость передачи может сильно варьироваться (Mikan et al., 2000; Johnson et al., 2002; Steinmann et al., 2004; Passioura, 1972).

Сочетание гидравлической и химической сигнализации в растениях указывает на то, что объединение двух сигнальных путей может способствовать более быстрой передаче и, следовательно, более быстрому отклику растения. Химический сигнал, транспортируемый из повреждённого участка, может быстро передаваться с помощью гидравлических сигналов до тех пор, пока раневые сигналы поступают или вырабатываются в ксилемный сок в течение интервала времени распространения гидравлического сигнала (Boari, Malone, 1993). Несмотря на дискуссии о пригодности химических сигналов для дистантной сигнализации, они безусловно являются первой частью сигнальных каскадов, происходящих во взаимодействиях растений и листогрызущих насекомых и патогенов (Maffei et al., 2007a; Bruce, 2015).

Электрические сигналы были предложены в качестве одного из первичных ответов растения на биотическую атаку, возникающих за время порядка секунд – нескольких минут после повреждения, за которыми следует химический каскад сигналов (Maffei et al., 2007b.; Zebelo, Maffei, 2015). В ходе изменения мембранного потенциала инициируются вторичные мессенджеры (кальциевый сигнал (Reddy et al., 2011)), а также происходит образование оксида азота (NO) и его производных (Leitner et

al., 2009), АФК (Mittler, 2006), СК (Bari, Jones, 2009), увеличение ЖК, АБК, этилена (Dziubińska et al. 2003; Hlaváčková et al. 2006; Hlavinka et al. 2012), и в итоге это приводит к изменению в метаболизме растений.

Электрические сигналы в растениях могут иметь различный диапазон скоростей распространения в зависимости от типа сигнала (ПД или ВП). Некоторые эксперименты показывают, что скорость распространения ПД аналогична гидравлическим сигналам. При этом на скорость распространения ЭС также оказывает влияние способ раздражения и видовые особенности растения.

Показано, что возрастание АФК также коррелирует с электрическими сигналами. Сигналы АФК могут перемещаться по ксилеме со скоростью до 0,14 см/с (Miller et al., 2009), сравнимой со скоростями распространения электрических сигналов. Таким образом, в настоящее время имеются гипотезы, поддерживающие тесную связь между АФК и электрическими сигналами. Тем не менее, являются ли АФК активаторами или увеличивают интенсивность сигнала, остаётся нераскрытым.

Проявления взаимодействий АФК и фитогормонов как сигнальных соединений чрезвычайно разнообразны в растительном организме. Сигналы АФК тесно интегрированы с сигналами стрессовых фитогормонов: салициловой кислоты, жасмоновой и абсцизовой кислот, брассиностероидов и этилена (Foyer, Noctor, 2009; Harrison, 2012; Cui et al., 2011; Xia et al., 2011).

Таким образом, существуют различные доказательства того, что растения имеют несколько взаимосвязанных сигнальных путей, тем не менее пока недостаточно изучено их взаимодействие и степень значимости каждого пути для передачи информации. Например, дистанционный сигнал должен быть либо электрической, либо гидравлической природы, в то время как химические сигналы необходимы для запуска конкретных изменений метаболизма (Stratmann, Ryan, 1997). С другой стороны, некоторые данные подтверждают, что гидравлические волны необходимы для распространения сигнала, но иногда они не в состоянии инициировать химические сигнальные каскады (Malone et al., 1994). Перекрывание сигнальных путей показало неразрывную связь гидравлических сигналов и ВП. Кроме того, электрические сигналы могут инициировать химические сигналы, и химические сигналы в свою очередь могут усиливать гидравлические сигналы, в результате чего осуществляется петля обратной связи для всех типов сигналов.

1.2. Влияние стрессовых сигналов на функциональное состояние растений

В настоящее время существует большее число работ, которые показывают влияние электрических, химических (гормональных и АФК-) сигналов на функциональное состояние растений (Fujita et al., 2006; Fromm, Lautner, 2007; Ślesak et al., 2007; Foyer, Noctor, 2009; Hirayama, Shinozaki, 2010; Gallé et al., 2015; Niu, Liao, 2016 и др.). В частности, стрессовые сигналы вызывают активацию экспрессии участвующих в адаптации генов, изменение транспирации, модификацию ростовых процессов, ответы фотосинтеза и дыхания и т.д. Конечным результатом этих процессов является, по-видимому, повышение устойчивости растений к действию различных неблагоприятных факторов среды (Fujita et al., 2006; Ślesak et al., 2007; Foyer, Noctor, 2009; Allakhverdiev et al., 2008; Креславский, 2010; Sukhov, 2016).

Показано, что рост концентрации гормона АБК подавляет транспирацию и повышает засухоустойчивость (Xiong et al., 2002; Wilkinson et al., 2012); брассиностероиды могут увеличивать устойчивость растений к экстремальным температурам и повышенным концентрациям солей (Kagale et al., 2007; Sharma et al., 2013); увеличение содержания ауксина ускоряет ростовые процессы за счет активации H^+ -АТФазы плазматических мембран и закисления апопласта (Zhang et al., 2005).

Последние исследования показали, что АФК, в частности, пероксид водорода, является посредником в ауксин-регулируемом геотропизме. Этот механизм реализуется через ассиметричную генерацию пероксида в корнях кукурузы, также ассиметрично располагается и ауксин. Ассиметричное применение пероксида водорода или антиоксидантов способствует либо ингибирует геотропизм (Neill et al., 2002).

ЭС индуцируют различные физиологические ответы в растениях (Fromm, Lautner, 2007; Gallé et al., 2015). Они повышают экспрессию *pin2* генов (Peña-Cortés et al., 1995; Stankovic', Davies, 1996; Fisahn et al., 2004); снижают синтез белков (Fromm, Lautner, 2007); стимулируют продукцию абсцизовой и жасмоновой кислот, системина и этилена (Dziubińska et al., 2003; Fisahn et al., 2004; Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Mousavi et al., 2013); активируют дыхание (Dziubińska, Trêbacz, 1989; Filek, Kościelniak, 1997; Sukhov et al., 2012, 2014a; Lautner et al., 2014); изменяют активность транспирации и открытость устьиц (Koziolek et al., 2004; Grams et al., 2007; Sukhov et al., 2012); снижают загрузку метаболитов во флоэму (Fromm, 1991; Fromm, Bauer 1994) и масс-

перенос во флоэме (Furch et al., 2010); уменьшают рост стебля растяжением (Fromm, Lautner 2007); регулируют движение листьев (Sibaoka, 1991; Volkov et al., 2008a, b); индуцируют остановку цитоплазматического потока (Fromm, Lautner, 2007) и повышают устойчивость целого растения к действию стрессоров (Ретивин et al., 1997).

Гидравлические сигналы также принимают участие в защите растений при стрессе. Системный ответ на механическое повреждение растительной ткани был детально изучен у растений, принадлежащих к семейству пасленовых (Green, Ryan, 1972; Peña-Cortés et al., 1988). Так, было показано, что повреждение листьев томата (*Solanum lycopersium*) гусеницами *Spodoptera* вызвало значительный гидравлический сигнал, измеренный по увеличению толщины отдалённого листа (Alarcon, Malone, 1994), который инициировал повышение активности генов ингибиторов протеиназ (Malone, 1994). Такой ответ на повреждение может иметь большое значение в защите растения от насекомых-вредителей и патогенных микроорганизмов (Green, Ryan, 1972).

С учетом ключевой роли фотосинтеза в жизни растений влияние стрессовых сигналов на фотосинтетические процессы представляет особый интерес. В этой проблеме можно выделить два аспекта: влияние сигналов на фотосинтетическую активность в нормальных условиях и их влияние на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию неблагоприятных факторов.

Многочисленные работы показывают, что локальные раздражения и, возможно, индуцированные ими ЭС влияют на фотосинтез (Peña-Cortés et al., 1995; Koziol et al., 2004; Hlaváčková et al., 2006; Krupenina, Bulychov, 2007; Grams et al., 2009; Pavlovič et al., 2011; Hlavinka et al., 2012; Sukhov et al., 2012, 2013b, 2014a; Fromm et al., 2013). Так, можно выделить различные типы фотосинтетических ответов, включая быструю и длительную инактивацию фотосинтетических процессов, а также их активацию (Fromm, Fei, 1998; Bulychov et al., 2004; Krupenina, Bulychov, 2007; Sukhov et al., 2012, 2014a; Sukhov, 2016). По-видимому, тип ответа зависит от фактора, вызывающего электрический сигнал, и, возможно, вида растения (Peña-Cortés et al., 1995; Fromm et al., 2013; Sukhov, 2016).

Сходство механизмов генерации ПД и ВП предполагает, что физиологические ответы схожи, однако экспериментальные результаты противоречивы. Ответы могут быть очень похожи, например, ПД- и ВП-индуцированная активация дыхания (Шерстнева и др., 2015 а; Filek, Kościelniak, 1997; Sukhov et al., 2014a), но могут и

существенно различаться, например, изменения транспирации, индуцированные ожогом (ВП) и ледяной водой (ПД) (Lautner et al. 2005). Возможно, что этот вопрос требует отдельного анализа для каждого физиологического ответа.

В случае гидравлического сигнала отрицательное изменение давления ксилемы (повышение давления) может быть вызвано абиотическими стресс-факторами, такими как засоление и засуха (Breda et al., 2006), которые инициируют сходные сигнальные пути (Zhu, 2001). В течение осмотического стресса или засухи инициирование гидравлического сигнала происходит в корне – органе, который первым подвергается воздействию нехватки воды, и передается через стебель в листья, где паренхимные клетки воспринимают этот сигнал (Endo et al., 2008; Christmann et al., 2013), что вызывает производство фитогормона абсцизовой кислоты (АБК), чтобы инициировать закрытие устьиц (Bauer et al., 2013). Уменьшение давления в ксилеме при вытеснении воды во время засухи при наличии гидравлического сигнала приводит к уменьшению нетто фотосинтеза, транспирации и устьичной проводимости (Kim et al., 2004).

Влияние гормонального сигнала на фотосинтез определяется, прежде всего, конкретным типом фитогормона. Так, снижение активности фотосинтетических процессов может быть вызвано действием АБК, жасмоновой кислоты (Herde et al., 1997; Lovelli et al., 2012; Hlavinka et al., 2012) и этилена (Iqbal, Ashraf, 2013), в то время как ауксины (Ehlert et al., 2008) и брассиностероиды (Fariduddin et al., 2013) скорее способствуют его стимуляции.

АФК-сигналы вызывают, по-видимому, инактивацию фотосинтетических процессов, что обычно объясняется фотоингибированием фотосистемы II (Vass et al., 1992; Keren et al., 1997; Аллахвердиев, 2002). Чувствительность фотосистемы II (ФСII) к условиям окружающей среды определяется подавлением процесса её репарации активными формами кислорода. Избыточное освещение приводит к фотоингибированию ФСII как наиболее чувствительной к свету. Поэтому в живых организмах происходит постоянная репарация ФСII за счёт деградации и синтеза белка D1. Степень фотоповреждения, а как следствие и интенсивность фотосинтеза, определяется возможностью восстановления ФСII. В свою очередь она зависит от чувствительности системы репарации к АФК, которые способны инактивировать репарацию путём подавления синтеза белков. Подавление синтеза белка D1 может быть связано с нарушением окислительно-восстановительного регулирования, что приводит к

предотвращению дальнейшего окислительного повреждения (Nishiyama et al., 2011). В некоторых случаях АФК-сигналы способны снижать активность фотосинтеза, действуя на фотосистему I (Sejima et al., 2014; Takagi et al., 2016), а также нарушать репарационные процессы фотосистемы II (Nishiyama et al., 2001; Murata et al., 2017).

Однако возможны и не связанные с повреждением пути опосредованного влияния АФК на фотосинтез при интеграции нескольких сигнальных систем. Например, взаимодействие АФК с фитогормоном АБК в ответ на засуху вызывает сигнальный каскад в замыкающих клетках, что приводит к закрытию устьиц (Ślesak et al., 2007; Foyer, Noctor, 2009; Pei et al., 2000; Kim et al., 2010), тем самым уменьшая потерю воды. Также участие в процессе закрывания устьиц может принимать жасмоновая кислота (Munemasa et al., 2011). Степень открытости устьиц влияет на интенсивность процесса фотосинтеза, так как увеличение ширины устьичных щелей сопровождается увеличением поглощения CO_2 , а при полном закрытии устьиц фотосинтез протекает, но в очень слабой степени (Медведев, 2012). Кроме того, АФК могут влиять на фотосинтез, изменяя редокс-потенциал редокс-чувствительных клеточных компонентов, таких как пластохиноновый пул и тиоредоксин (Креславский и др., 2012).

Пути влияния стрессовых сигналов на фотосинтез в значительной степени зависят от механизмов их развития, что, однако, не исключает тесного взаимодействия между ними. Так, развитие быстрой инактивации фотосинтеза, вызванной электрическими сигналами, по-видимому, опосредуется возрастанием внутриклеточной концентрации кальция (Булычев, Комарова, 2014; Krupenina, Bulychiev, 2007) и/или изменениями внутри- и внеклеточного pH (Шерстнева и др., 2015a, 2015b; Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2014a; 2015b; Sukhov, 2016), при этом, учитывая ингибирующее влияние Ca^{2+} на H^+ -АТФазу плазматической мембраны (Воденеев и др., 2006), представляется весьма вероятной тесная связь обоих механизмов (Sukhov, 2016). Вероятно, что последующее развитие инактивации фотосинтеза главным образом связано с пониженным входом CO_2 и инактивацией темновых реакций фотосинтеза, которая индуцирует снижение квантовых выходов фотохимических реакций фотосистем I и II и рост нефотохимического тушения флуоресценции фотосистемы II и циклического потока электронов вокруг фотосистемы I. Однако возможны также другие пути влияния ЭС на световые реакции фотосинтеза. Один из них может быть связан с закислением стромы хлоропластов, которое индуцирует аккумуляцию ферредоксин-НАДФ⁺-редуктазы на тилакоидах.

В то же время, вход ионов кальция и повышение его концентрации в цитоплазме могут быть вызваны пероксидом водорода (Ślesak et al., 2007; Niu, Liao, 2016) и действием некоторых фитогормонов, например, АБК (Kim et al., 2010). Данные о способности гормонального и АФК-сигналов влиять на pH (Zhang et al., 2005; Gonugunta et al., 2009) являются дополнительным аргументом в пользу возможной общности механизмов действия стрессовых сигналов. Другим примером взаимодействия сигналов является участие АБК и жасмоновой кислоты в развитии вызванной электрическими сигналами длительной инактивации фотосинтеза (Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012).

Ещё одна важная проблема – влияние стрессовых сигналов на устойчивость фотосинтетического аппарата, который испытывает серьёзные перестройки под действием абиотических стрессов. Абиотический стресс приводит к чрезмерному восстановлению цепи переноса электронов (ЭТЦ), которое, в свою очередь, приводит к фотоокислению (Takahashi, Murata, 2008; Takahashi, Badger, 2011). Для того чтобы выжить в этих условиях, растения преобразуют избыток поглощенной световой энергии в тепловую энергию (нефотохимическое тушение NPQ) (Nath et al., 2013; Gururani et al., 2012, 2013, 2015a; Rochaix, 2014; Jaspers, Kangasjärvi et al., 2010; Spetea et al., 2014; Grieco et al., 2012).

Имеются экспериментальные данные, которые показывают положительное влияние гормонального сигнала (Креславский и др., 2011; Ivanov et al., 1995; Mayaba et al., 2001; Larkindale, Knight, 2002; Agami, Mohamed, 2013; Cortleven et al., 2014) на устойчивость фотосинтетического аппарата к экстремальным температурам, засухе, свету высокой интенсивности, тяжелым металлам, УФ-радиации и другим неблагоприятным факторам. Недавние исследования показали, что различные гормоны и факторы транскрипции, регулируемые этими гормонами (Gururani et al., 2015б) могут модулировать экспрессию генов, участвующих в процессе фотосинтеза, эффективность комплекса ФСII и накопление хлорофилла при абиотических стрессах (Rivero et al., 2010; Zhao et al., 2008; Komatsu et al., 2010; Toledo-Ortiz 2014; Nakamura et al., 2009). Тем не менее, важно отметить, что запутанная природа перекрестных путей между различными гормональными сигналами делает чрезвычайно трудным выяснение ключевой роли специфических гормонов в тонкой настройке экспрессии генов, регуляции фотосинтеза и регулировании системы восстановления фотоповреждений.

Имеются также данные о положительном влиянии на устойчивость фотосинтетического аппарата электрических сигналов (Ретивин и др., 1999; Sukhov,

2016) и АФК-сигнала (Xia et al., 2009). При этом представляется весьма вероятным, что положительное влияние стрессовых сигналов на устойчивость фотосинтетического аппарата к стрессовым воздействиям может быть связано с развитием фотосинтетического ответа, индуцированного такими сигналами (Sukhov, 2016). Однако это утверждение требует дальнейшего анализа.

Другим путем такого влияния как на растение в целом, так и на фотосинтетический аппарат, может быть повышение активности антиоксидантной системы растений при действии стрессовых сигналов (Креславский, 2010). Вследствие этого выявление механизмов влияния электрических, гормональных и АФК-сигналов на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию неблагоприятных факторов, а также анализ связи такого влияния с фотосинтетическими ответами при отсутствии стрессовых факторов является весьма актуальной задачей.

Не менее существенный интерес представляет анализ вклада повышения устойчивости фотосинтетического аппарата в изменение устойчивости к неблагоприятным факторам на уровне целого растения, которое также может индуцироваться стрессовыми сигналами различной природы (Ślesak et al., 2007; Sreenivasulu et al., 2012; Sukhov, 2016).

Таким образом, несмотря на многочисленные работы о воздействии стрессовых сигналов на растения, дальнейшее рассмотрение влияния сигнальных путей (электрических, химических и гидравлических) на фотосинтетическую активность и устойчивость при действии неблагоприятных факторов может стать важным шагом на пути исследования механизмов и особенностей развития функциональных ответов растений и основанием для получения более реалистичного представления о существовании растений в естественных условиях.

Особый интерес на пути к достижению этих целей представляет исследование влияния на функциональное состояние и устойчивость растений ЭС, как наиболее вероятных кандидатов, в силу перечисленных выше особенностей, на роль быстрого дальнего сигнала в интеграции частей растения в единое целое.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Исследования проводили на 2-3-недельных проростках гороха (*Pisum sativum* L.). Растения выращивали гидропонным способом (50% среда Хогланда-Арнона) в климатической камере KBW-240 (Binder GmbH, Германия) при освещении люминесцентными лампами (16-ти часовой световой период) и температуре 24°C. Измерения проводили на верхних зрелых листьях с адаптацией растения к условиям измерения в течение 1,5 часов.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Регистрация электрической активности у растений

Электрическую активность регистрировали внеклеточно с помощью Ag/AgCl макроэлектродов ЭВЛ-1МЗ (Гомельский приборный завод, Гомель, Беларусь), заполненных 3М KCl. Использовалось два измерительных электрода: один из них располагался на стебле растения ($\text{Э}_{\text{ст}}$), другой – в центре листовой пластинки ($\text{Э}_{\text{л}}$) не стимулируемого листа у гороха. Расстояние между электродом, располагающимся на стебле ($\text{Э}_{\text{ст}}$) и зоной раздражения составляло 6-7 см, если электрод находился рядом со вторым зрелым листом растения, либо 15-18 см, если он располагался рядом с четвёртым листом. Измерительные электроды контактировали с растительной тканью через электропроводящий гель «Унигель» (Гельтек-Медика, Москва, Россия). Электрод сравнения находился рядом с корнями растения либо в стандартном растворе, содержащем 0,1 мМ NaCl, 0,1 мМ KCl, 0,5 мМ CaCl₂. Поверхностный потенциал регистрировался с помощью высокоомного усилителя ИПЛ-113 (Семико, Новосибирск, Россия) и персонального компьютера.

Электрический сигнал в виде переменного потенциала индуцировали классическим повреждающим раздражением – ожогом открытым пламенем (Koziolek et al., 2004; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009) кончика листа, соседнего с исследуемым, наносимым в течение 3 с. Площадь повреждения составляла 1 см².

Для одновременной записи поверхностного потенциала и фотосинтетических параметров с одного листа стандартная измерительная головка для исследования фотосинтеза размещалась на одной из долей исследуемого листа гороха. Амплитуда

индуцированной ожогом электрической активности парных долей листа совпадала с хорошим коэффициентом корреляции 0,94. Поскольку электрические ответы парных долей листа гороха были очень похожи, электрическая реакция, зарегистрированная $E_{\text{л}}$, использовалась для исследования параметров ВП в парном листочке, в котором измерялись параметры фотосинтеза (рис. 2.1).

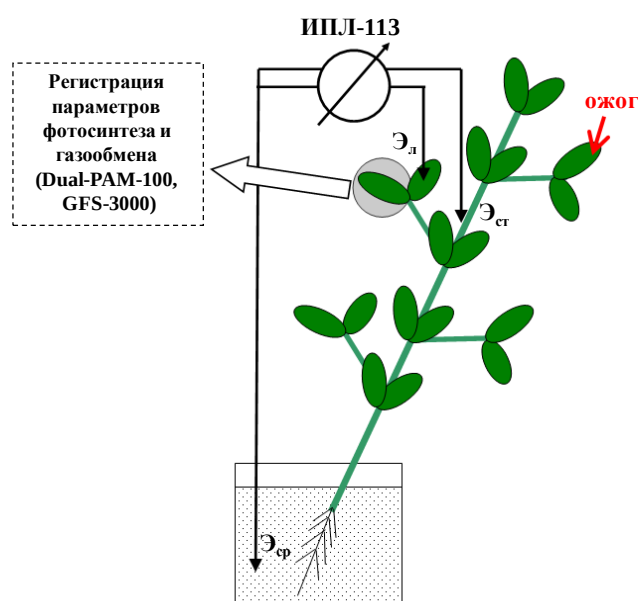


Рис. 2.1. Схема установки для одновременной регистрации изменений поверхностного электрического потенциала и фотосинтетической активности $E_{\text{л}}$ — измерительный электрод, располагающийся на листе; $E_{\text{ст}}$ — измерительный электрод, располагающийся на стебле или черешке листа растения; $E_{\text{сп}}$ — электрод сравнения.

Для оценки внутриклеточного мембранного потенциала ($E_{\text{м}}$) в клетках мезофилла листа был использован микроэлектродный метод. Измерительная система включала в себя микроскоп SliceScope Pro 2000 (Scientifica, Акфилд, Соединенное Королевство), усилитель Multiclamp 700B (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния, США), систему получения данных с низким уровнем шума для электрофизиологии DIGIDATA 1550 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния, США), и ПК. Микроэлектродные пипетки были изготовлены с использованием Sutter Micropipette Puller P-97 (Sutter Instrument, Новато, Калифорния, США). Микроэлектроды, заполненные 100 мМ KCl, подводились к клеткам мезофилла листовой пластинки второго или четвертого листа. Электрод сравнения помещался в стандартный раствор, контактирующий с листом.

2.2.2. Изучение фотосинтетической активности и транспирации

В экспериментах на интактных проростках гороха использовали стандартную систему для исследования фотосинтетических процессов (Heinz Walz GmbH, Эффельтрих, Германия), включающую газоанализатор GFS-3000, РАМ-флуориметр Dual-PAM-100 – систему для одновременной регистрации окисления P700 и флуоресценции хлорофилла, и измерительную головку Dual-PAM gas-exchange Cuvette 3010-Dual. Данный комплекс позволял осуществлять одновременное измерение параметров световой и темновой стадии фотосинтеза на участке нестимулируемого листа ($1,3 \text{ см}^2$).

РАМ-флуориметр Dual-PAM-100 работает по принципу импульсного модулирования, когда в качестве измеряющего излучения используется импульсный свет низкой интенсивности. Возникающая в результате вспышки измеряющего света разница в сигнале флуоресценции усиливается специальным селективным усилителем.

Флуориметр обеспечивал четыре варианта освещения объекта (Maxwell, Johnson, 2000; Корнеев, 2002):

ML (*measuring light*) – измерительный свет – слабый свет, не вызывающий фотохимических реакций;

AL (*actinic light*) – действующий (актиничный) свет, поддерживающий фотосинтез;

SP (*saturation pulses*) – короткие вспышки насыщающего света, интенсивность которого достаточна для быстрого восстановления пула пластохинонов;

FR (*far-red light*) – дальний красный свет, возбуждающий только ФСІ. Его применение при выключенном AL свете позволяет быстро окислить пул пластохинонов за счёт оттока электронов с ФСІ (Joliot, Joliot, 2006).

Отметим также, что в использованной нами модели прибора применяется также инфракрасный свет на двух длинах волн (830 и 875 нм), разность в поглощении которых применяется для оценки окисленности ФСІ (Klughammer, Schreiber, 2008).

Значения базовых параметров флуоресценции ФСІІ, темновой уровень флуоресценции (F_0), максимальный уровень флуоресценции (F_m) и уровень вариабельной флуоресценции ($F_v = F_m - F_0$), измерялись после 20 мин темновой адаптации. Интенсивность измерительного света (460 нм) при этом составляла $24 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. Максимальное изменение сигнала от P₇₀₀ (P_m), означающее окисление

хлорофилла P_{700} , измерялось после предварительной подсветки дальним красным светом в течение 10 с. После этого включали синий актиничный свет ($239 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$, 460 нм) и насыщающие вспышки ($10000 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$, 635 нм , 300 мс). Постоянный уровень флуоресценции на свету (F), максимальный уровень флуоресценции (F_m'), постоянный уровень сигнала поглощения P_{700} (P), максимальное изменение сигнала P_{700} на свету (P_m') измерялись после периодически следующих насыщающих вспышек каждые 10 с (рис. 2.2.).

На основе базовых параметров фотосинтеза программными средствами рассчитывались коэффициенты, характеризующие работу электрон-транспортной цепи:

квантовый выход ФCI (Klughammer, Schreiber, 2008)

$$\gamma(\text{PSI}) = (P_m' - P) / P_m'; \quad (1)$$

квантовый выход ФCII (Maxwell, Johnson, 2000)

$$\gamma(\text{PSII}) = (F_m' - F) / F_m'; \quad (2)$$

нефотохимическое тушение флуоресценции ФCII (Maxwell, Johnson, 2000)

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'; \quad (3)$$

квантовый выход потерь, связанных с акцепторной стороной ФCI (Klughammer, Schreiber, 2008)

$$\gamma(\text{NA}) = (P_m - P_m') / P_m'; \quad (4)$$

квантовый выход потерь, связанных с донорной стороной ФCI (Klughammer, Schreiber, 2008)

$$\gamma(\text{ND}) = P / P_m'. \quad (5)$$

Электронные потоки через ФCI [$\text{EF}(\text{PSI})$] и ФCII [$\text{EF}(\text{PSII})$] были рассчитаны с использованием уравнений (6) и (7) (Miyake et al., 2004, 2005; Huang et al., 2012; Zivcak et al., 2013):

$$\text{EF}(\text{PSI}) = \alpha I \times \gamma(\text{PSI}) \times \text{PFD}, \quad (6)$$

$$\text{EF}(\text{PSII}) = \alpha I \times \gamma(\text{PSII}) \times \text{PFD}, \quad (7)$$

где PFD – фотосинтетически-активная плотность потока фотонов света освещающего лист; $\alpha I = p \times (1 - dII)$ и $\alpha I = p \times dII$ – доли потока фотонов, распределяемые на ФCI и ФCII, dII – доля поглощенного света, попавшего на ФCI; p – доля PFD , поглощённого листом.

Поток электронов через ФСІ включает нециклический, псевдоциклический и циклический потоки, в то время как поток электронов через ФСІІ включает только нециклический, псевдоциклический потоки (Allen, 2003). Таким образом, циклический поток электронов ($EF(C)$) описывается уравнением (8) (Miyake et al., 2004, 2005; Huang et al., 2012; Zivcak et al., 2013):

$$EF(C) = EF(PSI) - EF(PSII). \quad (8)$$

Расчет $EF(C)$ требует значений для p и dII (уравнения (6)-(8)). Величину p измеряли в соответствии с Berger et al. (2004), используя стандартную процедуру в IMAGING-PAM M-Series MINI Version (Heinz Walz GmbH) и обнаружили, что $0,88 \pm 0,01$ ($n = 10$).

Для измерения dII был использован метод, описанный в работе Huang et al. (2012). Известно, что растения имеют небольшой по величине циклический поток электронов при низкой интенсивности света, и что величина потока возрастает с увеличением PFD (Miyake et al., 2005; Joliot, Joliot, 2006; Huang et al., 2011; Zivcak et al., 2013). Таким образом, $EF(PSI)$ приблизительно равен $EF(PSII)$ в условиях низкой освещенности (Huang et al., 2012). Принимая во внимание, что $EF(PSI) = EF(PSII)$ и с использованием уравнений (6) и (7), было получено уравнение (9):

$$dII = \frac{1}{\gamma(PSII)/\gamma(PSI) + 1}. \quad (9)$$

Здесь dII устанавливается $\sim 0,42$ в условиях пониженной освещенности ($PFD \leq 65$ мкмоль/м²с). Увеличение dII наблюдалось в условиях при интенсивности света 108 мкмоль/м²с и выше. Это увеличение, возможно, отражает увеличение циклического потока электронов, т.е. $EF(PSI) = EF(PSII)$ при средней и высокой освещенности. Также уравнение (7) может быть использовано для вычисления dII при слабом актиничном свете (≤ 65 мкмоль/м²с).

Значение dII вычислялось после 1 часа освещения контрольным актиничным светом (239 мкмоль/м²с) в соответствии со временем индукции ВП. Однако dII может зависеть от продолжительности освещения актиничным светом, что может повлиять на результаты. Значение dII снижалось с 0,51-0,53 до $\sim 0,41$ -0,46 при увеличении продолжительности освещения ($t_{1/2} = 20$ мин), но практически не менялось с 60 по 100 мин, т.е. dII постоянно в диапазоне времени записи фотосинтетического ответа.

Начальные изменения dII могут быть связаны с переходным состоянием (*state-transition*) и/или повреждением ФСII. Период протекания переходного состояния лежит в пределах от минут до десятков минут, а период восстановления после повреждения измеряется часами (Maxwell, Johnson, 2000; Müller et al., 2001). В результате переходные процессы скорее всего изменятся под влиянием ВП, нежели при повреждении ФСII. Анализ кинетики релаксации F_m' в темноте после 1 часа освещения актиничным светом показал, что в этом параметре имеются незначительные изменения с 5 по 40 мин, т.е. в этих условиях не наблюдалось переходного состояния. Дополнительно этот результат подтверждает наблюдаемое постоянство dII во временном промежутке ВП-индуцированных фотосинтетических ответов. Принимая это во внимание, мы использовали значение $dII = 0,42$.

В отдельных сериях экспериментов в качестве актиничного использовался дальний красный свет ($239 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$, 460 нм), который преимущественно поглощается ФСI. В этом случае $EF(PSII)$ также описывался уравнением (7); в то же время, незначительное поглощение дальнего красного света ФСII (Joliot, Johnson, 2011) было принято за ноль, и значение PFD было низким ($5 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$, измерительный свет). При этом $EF(PSII)$ описывался уравнением (10)

$$EF(PSI) = p \times (1 - dII) \times \gamma(PSI) \times (PFD + FRFD \times \delta), \quad (10)$$

где $FRFD$ – плотность потока дальнего красного света, δ – отношение поглощения дальнего красного света к поглощению актиничного света листом (730 и 460 нм) соответственно, $PFD = 5 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$, δ вычислялась из спектра поглощения листом и составляла $\sim 0,12$.

Интервал между началом освещения листа и нанесением раздражения составлял 1 ч. Регистрация изменений CO_2 и H_2O осуществлялась с использованием стандартного инфракрасного газоанализатора (GFS-3000) одновременно с измерениями флуоресценции. При этом оценивались такие параметры как уровень ассимиляции CO_2 (A , $\text{мкмоль } CO_2 \text{ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), уровень транспирации (E , $\text{ммоль } H_2O \text{ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), которые рассчитывались на основании показателей газоанализатора программными средствами на основе работы S. von Caemmerer, G.D. Farquhar (1981).

Относительная величина индуцированного ВП снижения A была вычислена как $\Delta A_{ВП}/\Delta A_{hv}$, где $\Delta A_{ВП}$ – максимальное снижение ассимиляции CO_2 , индуцированное ВП, а ΔA_{hv} – максимальное увеличение ассимиляции CO_2 при включении освещения. Относительная величина снижения A была использована для вычисления корреляции

между снижением ассимиляции CO_2 и устойчивостью фотосистем к высокотемпературному прогреву.

С помощью газоанализатора GFS-3000 осуществлялся прогрев листа, контролировались температура (начальная температура $23\text{--}24^\circ\text{C}$ на поверхности листа) и влажность воздуха (20000 мкмоль/л, соответствующая 65% относительной влажности воздуха при 24°C), а также содержание внешнего CO_2 (нормальное значение в контроле 360 мкмоль/л, низкое содержание $\text{CO}_2 \sim 10\text{--}15$ мкмоль/л).

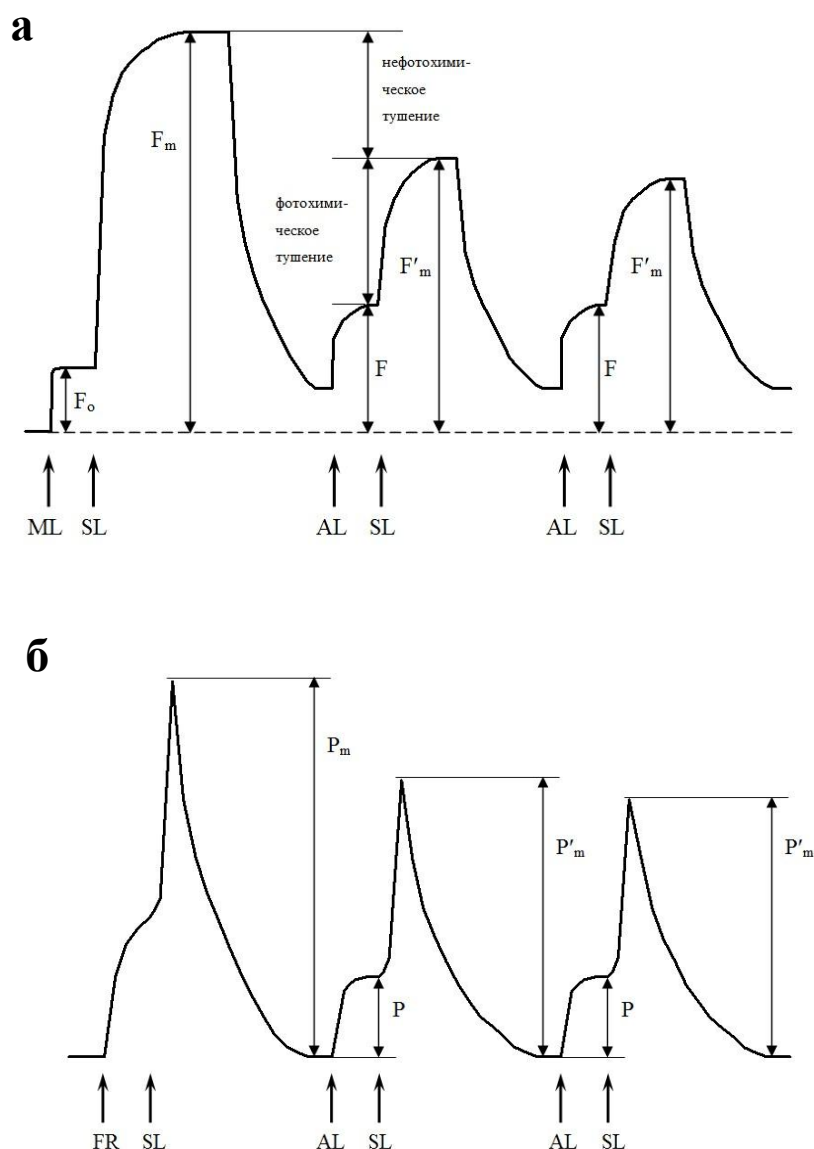


Рис. 2.2. Схематические примеры записей динамики флуоресценции (а) и абсорбции света (б) фотосинтетическим аппаратом растения для определения базовых параметров (F_o , F_m , F'_m , F , P_o , P_m , P'_m , P) световой стадии фотосинтеза. Вертикальные стрелки, направленные вверх, обозначают включение различных источников света (по Д. Ю. Корнееву (2002), С. Klughammer, U. Schreiber, (2008)).

2.2.3. Изучение устойчивости фотосинтетического аппарата листа к прогреву

Прогрев листьев растений до высоких температур часто используется для оценки термостабильности фотосинтетического аппарата (Lipova et al., 2010). Мы осуществляли прогрев листа и запись фотосинтетических параметров для изучения влияния ВП на устойчивость фотосинтетического аппарата к высоким температурам. Листья экспериментальных растений прогревались через 15 и 45 мин после генерации ВП, в качестве контроля использовались растения без раздражения, но с воздействием высокой температуры. Лист локально прогревался с использованием комплекса, описанного в предыдущем блоке (GFS-3000, Dual-PAM-100 и Cuvette 3010-Dual), после 1,5 часов после помещения его в специальную зажимную кювету Cuvette 3010-Dual (10 мин темновой адаптации, 1 час 20 мин при использовании актиничного света), начальная температура листа ($T_{\text{л}}$) составляла 23°C. Продолжительность прогрева составляла 30 мин, затем 10 мин возвращалась к исходному значению. $T_{\text{л}}$ повышалась с 23 до 44-48°C через 10 мин после начала прогрева, затем выходила на стационарный уровень и возвращалась к 23°C за 10 мин после окончания прогрева. Скорость динамики изменения температуры на её линейном отрезке была $3,2 \pm 0,1$ °C/мин (нагревание) и $3,4 \pm 0,1$ °C/мин (возвращение к исходной температуре). Температура кюветы с листом ($T_{\text{кюв}}$) изменялась от 23 до 53°C.

Для оценки устойчивости фотосинтетического аппарата к прогреву были проверены несколько фотосинтетических параметров.

P_m и F_v означают количество фотосистем, способных к разделению зарядов (Maxwell, Johnson, 2000; Klughammer, Schreiber, 2008). Поэтому было вычислено отношение конечного P_m к начальному P_m ($P_m^{\text{кон}}/P_m^{\text{нач}}$) и отношение конечного F_v к начальному F_v ($F_v^{\text{кон}}/F_v^{\text{нач}}$) для выявления доли неповреждённых фотосистем I и II после прогрева. Фотосинтетические параметры, транспирация и температура листа записывались до темновой адаптации, значения F_v и P_m были записаны после 10 мин темновой адаптации растения до начала освещения. Величины квантовых выходов ФС I и ФС II, измеренные сразу после прогрева и через 10 мин после него, использовались для оценки повреждения фотосистем.

Согласно некоторым опубликованным данным (Ретивин и др., 1999a; Oukarroum et al., 2013) нагревание листа в горячей воде может быть использовано для быстрого повреждения фотосистем. В отдельной серии экспериментов мы проводили

инкубационный второго листа в горячей воде (5 мин, при различных температурах) при белом свете около $100 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. Затем определяли квантовый выход ФCI после 10 с освещения дальним красным светом (Klughammer, Schreiber, 2008) и измеряли максимальный квантовый выход ФCII (Maxwell, Johnson, 2000) через 15 мин и 135 мин после нагревания. Показатель $1-\gamma(\text{PSI})^0$ отражает активность ФCI, так как он показывает относительную скорость окисления ФCI на свету; показатель $\gamma(\text{PSII})^0$ отражает активность ФCII.

2.2.4. Ингибиторный анализ

Для оценки влияния ингибиторов на параметры электрической реакции и на её распространение по стеблю растения в отдельной серии экспериментов были использованы холодовой блок (ледяная вода) и блок на основе ингибирования метаболических процессов (азид натрия, 1 и 5 мМ NaN_3). Длина зоны, на которую наносился блокатор, составляла около 3 см. Зона находилась между первым и вторым зрелыми листьями. Блоки устанавливались перед нанесением раздражения (20 мин для воды со льдом и 120 мин для NaN_3). Для контрольных измерений использовали стандартный раствор.

Ингибиторный анализ механизма влияния ВП на транспирацию основывался на оценке изменения параметров электрической реакции и фотосинтетической активности при внесении во внеклеточную среду специфического ингибитора H^+ -АТФазы – ортованадата натрия 0,5 мМ (ОВ, Sigma-Aldrich, США). При этом исследуемый лист растения погружался в содержащий ингибитор стандартный раствор на 2 часа. Контрольный лист растения инкубировался в стандартном растворе без ингибитора. После этого лист просушивался фильтровальной бумагой и производилось измерение электрической активности и транспирации.

2.2.5. Изучение устойчивости целого растения к прогреву

Воздействие повышенной температуры на снижение роста растений исследовалось с использованием воздушного термостата ТВ-20-ПЗ-«К» (Касимовский приборный завод, Россия). При этом контрольные 14-и дневные растения без ВП и экспериментальные растения (15 и 45 мин после ВП) помещались в термостат, в котором происходило постепенное увеличение температуры с 23–24 до 51–55°C на

30 мин. Максимальная длина побега и корня измерялась через 5 дней (19-и дневные проростки) после воздействия высокой температуры. В отдельной серии экспериментов была измерена длина побега и корня у 14-и дневных растений.

2.2.6. Оценка содержания АТФ в листьях гороха

Для исследования влияния ВП на содержание АТФ в листьях гороха был использован чувствительный биолюминесцентный набор «АТФ determination kit» (Biaffin GmbH & Co KG, Кассель, Германия). Исследуемый лист отрезался и быстро взвешивался, затем тщательно растирался в 5% ледяной трихлоруксусной кислоте (Larsson, Olsson, 1979). Через 15 мин гомогенат нейтрализовался до pH=7,8 путём добавления небольшого объёма 3М КОН и разбавлялся в 12 раз перед измерением содержания АТФ. Каждая повторность включала калибровочные пробы, контрольные пробы (лист растения без раздражения) и экспериментальные пробы (лист стимулируемого растения через 5, 10, 20, 30, 40, 50, и 60 мин после индукции ВП). Для анализа использовались светосуммы кривых, полученных одновременно за 15 мин записи после добавления пробы на хемилюминометре Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., Уинуски, Вермонт, США). Содержание АТФ было измерено во втором и четвёртом зрелых листьях проростков гороха на свету и во втором листе в условиях затемнения. Измеренное содержание АТФ было очень вариабельно. Поэтому мы использовали два подхода чтобы снизить вариабельность: (1) содержание АТФ в листьях ([АТФ]) в покое было измерено у всех контрольных растений ($n = 14-26$), и (2) изменение содержания АТФ ($\Delta[АТР]$) после индукции ВП было оценено используя разницу между концентрацией АТФ экспериментального образца и концентрацией контрольной пробы ($n = 5-9$).

2.2.7. Статистика

Каждая серия экспериментов включала в себя 5-36 биологических повторностей. Каждый эксперимент проводился на отдельном растении. На рисунках представлены типичные записи, полученные в отдельных измерениях, а также средние значения величин со стандартными отклонениями среднего. Статистически значимые достоверные различия определялись с помощью t-теста Стьюдента.

ГЛАВА 3. РОЛЬ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА В ИНДУКЦИИ ОТВЕТОВ ФОТОСИНТЕЗА И ТРАНСПИРАЦИИ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

3.1. Характеристика ВП, вызванного локальным ожогом у проростка гороха

Локальный ожог первого зрелого листа индуцировал генерацию и распространение ВП у проростков гороха (рис. 3.1.), что было выявлено с помощью измерения поверхностного потенциала. Так, динамика поверхностного потенциала показала быструю фазу деполяризации и длительную фазу реполяризации вариательной формы (как с наличием «ПД-образных» спайков, так и без них, а также со вторичной деполяризацией или без неё). Общее время развития сигнала от начала деполяризации до конца реполяризации составило от ~10 до 60 мин. В некоторых случаях электрический потенциал не возвращался к исходному уровню и по прошествии 60 мин. Такие особенности сигнала хорошо соответствуют типичным свойствам вариательного потенциала (Воденеев и др., 2011; Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2012, 2015; Huber, Bauerle, 2016), которые развиваются при действии повреждающих стимулов и имеют вариательную форму и большую длительность.

В стебле, вблизи второго листа амплитуда ВП была примерно 67 мВ и около 43 мВ вблизи четвертого листа, декремент затухания ВП составлял около 6,4 %/см. В 85% случаев при ожоге первого зрелого листа ВП проходил по стеблю в листовую пластинку второго листа, который не был подвергнут стимуляции. При прохождении во второй лист наблюдалось существенное снижение величины ВП, его амплитуда составляла около 38 мВ. При этом в четвертый лист проходили лишь незначительные по своей величине электрические сигналы, их амплитуда составляла около 8 мВ. Скорости распространения ВП в лист составляли 0,05–0,32 см/с (при прохождении во второй зрелый лист) и 0,01–0,06 мм/с (при прохождении в четвертый зрелый лист).

Еще одной важной особенностью ВП является их способность проходить через участки физиологически неактивной и даже мертвой ткани (Оприлов и др., 1991; Fromm, Lautner, 2007), т.е. можно ожидать, что наложение на стебель того или иного блока (температурного или ингибиторного) не должно препятствовать распространению сигнала такого типа.

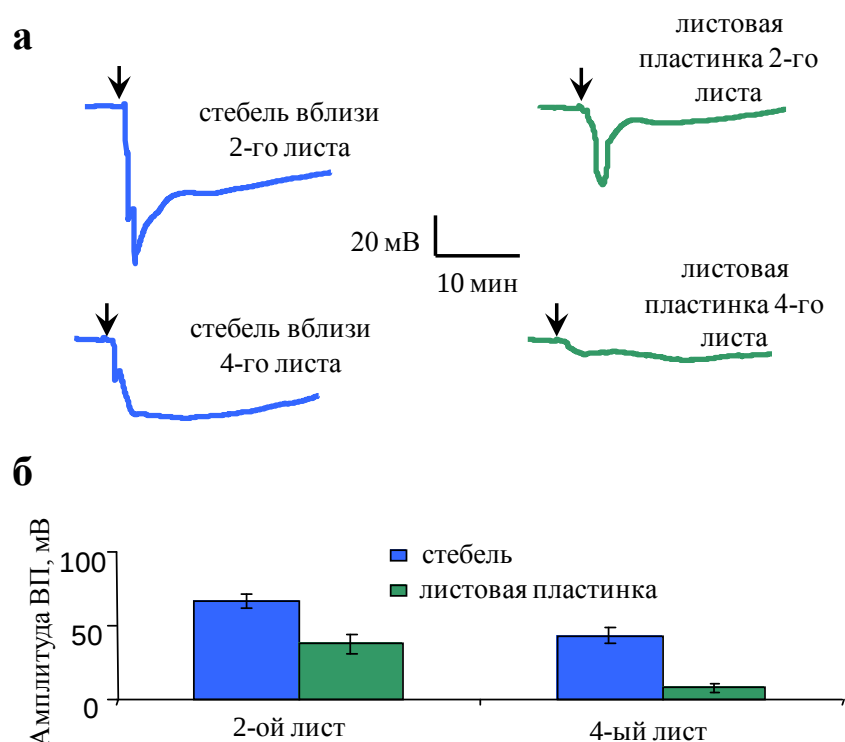


Рис. 3.1. Типичные примеры записей поверхностного электрического потенциала во втором и четвёртом листьях гороха, в стебле рядом с исследуемыми листьями (а), а также средние значения амплитуд ВП (б), ($n = 6$).

В ходе дальнейшего исследования был проведен анализ влияния на распространение ВП холодового блока (ледяная вода) и блока на основе ингибирования метаболических процессов (азид натрия, NaN_3). Исследование распространения ВП в этих условиях показало, что амплитуды ВП в стебле после прохождения наложенного на него блока составляли 36 ± 3 мВ в контроле (имитация блока стандартным раствором), 41 ± 4 мВ в эксперименте с холодовым блоком (ледяная вода), 43 ± 2 мВ и 32 ± 8 мВ в эксперименте с ингибиторным блоком (1 и 5 мМ NaN_3 , соответственно). Таким образом, наложение на стебель ингибиторного и холодового блока не подавляло распространение ВП по растению. Более того, в некоторых случаях (ледяная вода, 1 мМ NaN_3) наблюдалась даже недостоверная тенденция к возрастанию амплитуды электрического сигнала. Полученные результаты дополнительно подтверждают, что возникающий при ожоге у гороха электрический сигнал является именно вариабельным потенциалом, так как известно (Fromm, Lautner, 2007), что ВП способен проходить через мертвые и неактивные ткани.

Для более точной оценки параметров переменного потенциала в клетках мезофилла листа были проведены внутриклеточные измерения мембранного потенциала. Результаты таких измерений (рис. 3.2.) приблизительно соответствовали параметрам переменного потенциала, измеренного экстраклеточно. Так индуцированный ожогом первого зрелого листа ВП был гораздо более выражен в клетках мезофилла второго листа и представлял собой лишь слабо выраженный электрический сигнал в клетках четвертого листа. Амплитуды ВП составляли около 50 и 7 мВ во втором и четвертом листе соответственно, причем такие величины достоверно не отличались от амплитуд переменного потенциала, который был измерен во втором и четвертом листьях методом экстраклеточной регистрации.

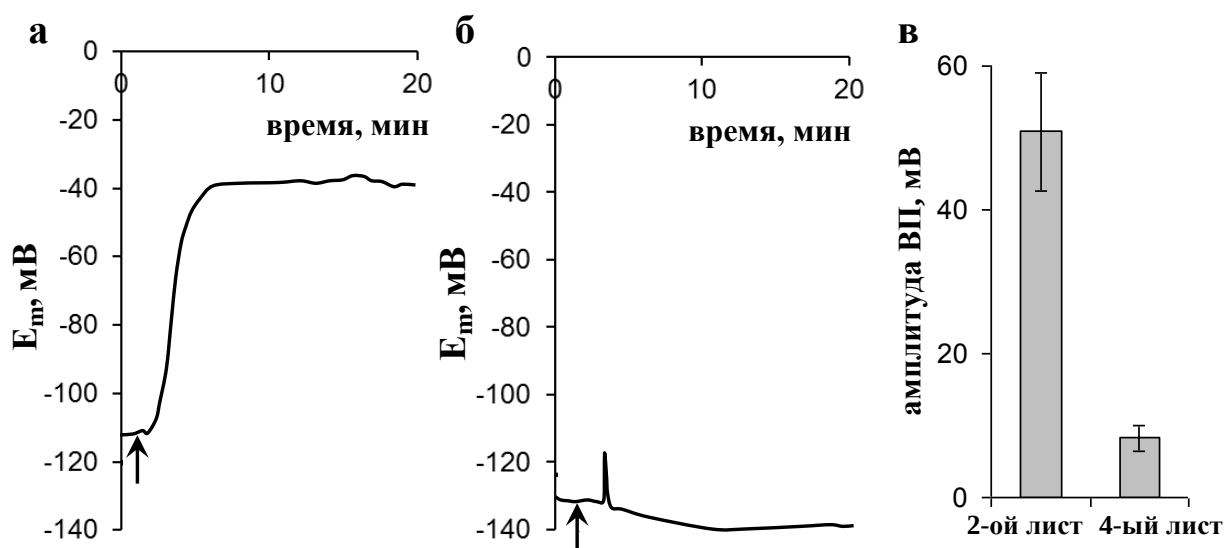


Рис. 3.2. Вызванные ожогом изменения мембранного потенциала клеток мезофилла (E_m) во втором (а) и четвертом (б) листьях, а также средние значения амплитуд электрических сигналов (в) ($n = 6-24$).

В целом параметры ВП, зарегистрированные у проростков гороха, сопоставимы с таковыми для ВП, возникающих у других высших растений (Malone, Stankovic, 1991; Stahlberg et al., 2005). Необходимо отметить, что ВП имел различную по форме длительную фазу реполяризации, которая не была осложнена возникновением импульсов, в отличие от ВП в стебле томата, тыквы и ряда других объектов (Stankovic et al., 1998; Rousset et al., 2002; Воденев и др., 2011).

3.2. Исследование влияния ВП на параметры фотосинтеза и транспирации у гороха

В литературе представлено значительное число работ, показывающих влияние локальных стимуляций растительных организмов на фотосинтетическую активность листьев растения, которые не были подвержены действию стимулов (Herde et al., 1995, 1999a; Peña-Cortés et al., 1995; Fromm, Fei, 1998; Koziolek et al., 2004; Hlaváčková et al., 2006; Grams et al., 2007, 2009; Pavlovič et al., 2011; Hlavinka et al., 2012; Sukhov et al., 2012, 2013b, 2014a; Fromm et al., 2013). В частности, многочисленные работы показывают, что локальные ожоги (Hlaváčková et al., 2006; Sukhov et al. 2012, 2013b, 2014a), механическое повреждение (Herde et al., 1995, 1999a; Grams et al., 2007, 2009; Pavlovič et al., 2011; Hlavinka et al., 2012), прикосновение (Koziolek et al., 2004; Fromm, Fei 1998; Fromm et al., 2013), действие электрического тока (Peña-Cortés et al. 1995; Bulychев et al., 2004; Krupenina, Bulychев, 2007; Булычев, Комарова, 2014) и другие стимулы могут вызывать временную инактивацию фотосинтеза. При этом предполагается (Шерстнева и др., 2015 а; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2012), что основным механизмом передачи сигнала от зоны действия стимула к зоне развития фотосинтетического ответа является распространение электрических сигналов, однако существуют лишь отдельные работы (Sukhov et al., 2012; Gallé et al., 2013), подтверждающие такую связь.

Вследствие этого проведено исследование влияния локальных ожогов на фотосинтетические процессы у гороха и оценка участия ВП в передаче сигнала от поврежденного участка к зоне фотосинтетического ответа. Было показано, что через несколько минут после распространения ВП в интактную листовую пластинку квантовые выходы фотосистем I и II ($\gamma(\text{PSI})$, $\gamma(\text{PSII})$), ассимиляция CO_2 (A) и транспирация (E) существенно снижались (рис. 3.3а). Динамика фотосинтетического ответа включала первую фазу снижения, которая развивалась в течение 5–10 мин после локального ожога и начала распространения ВП, и вторую фазу снижения, которая наблюдалась на временных диапазонах более 20 минут после индукции электрического сигнала. При этом развитие ВП в листе по времени на 1–2 минуты опережало начало развития фотосинтетического ответа, что хорошо согласуется с гипотезой об участии переменного потенциала в качестве связующего звена между зоной повреждения и зоной, в которой наблюдаются изменения фотосинтетической активности.

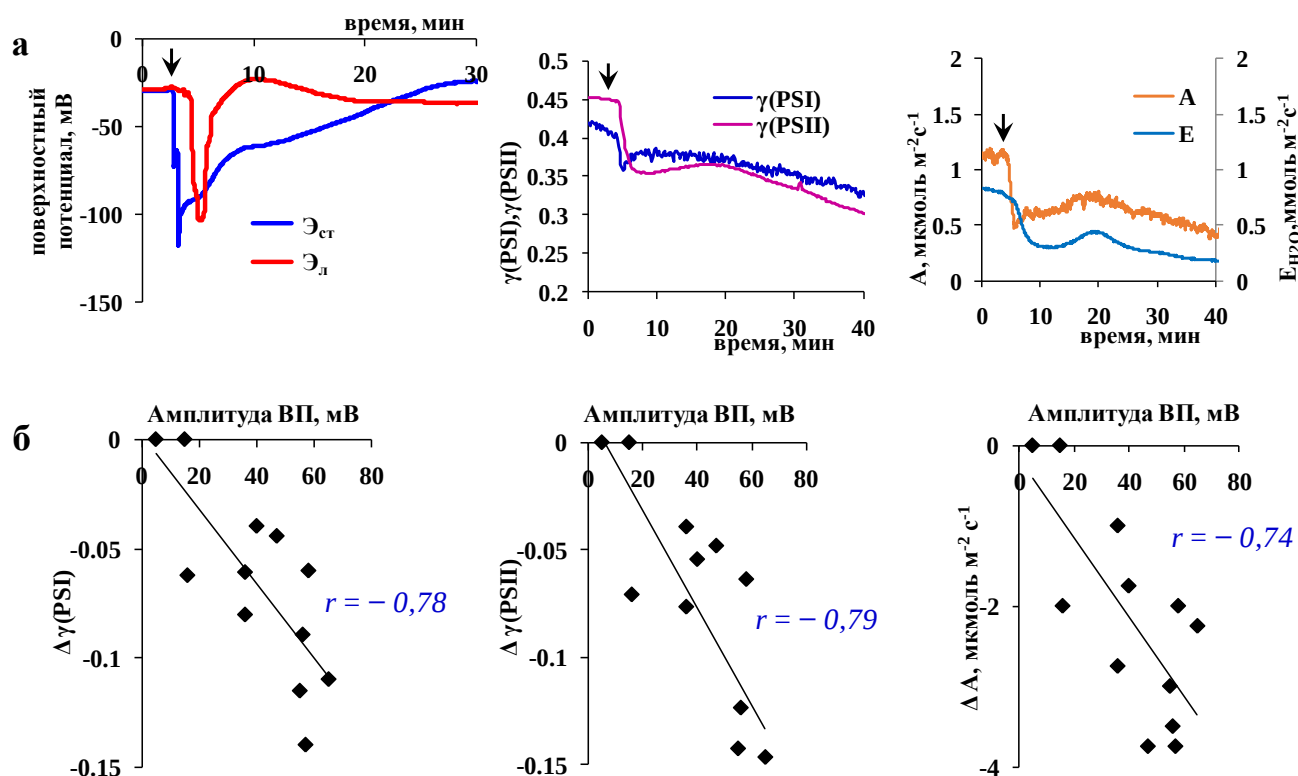


Рис. 3.3. Типичные записи изменений поверхностного потенциала ($E_{ст}$, $E_{л}$), параметров световой стадии ($\gamma(PSI)$ и $\gamma(PSII)$), ассимиляции CO_2 (A) и транспирации (E_{H_2O}), индуцированных локальным ожогом (стрелка), ВП распространяется в исследуемый лист ($n=25$); зависимости величины изменений уровня A, $\gamma(PSI)$ и $\gamma(PSII)$ (б) от амплитуды варибельного потенциала, индуцированного локальным ожогом у проростков гороха ($n=12$).

Другим важным результатом этого эксперимента является тот факт, что в некоторых случаях ВП распространялся по стеблю, но электрическая реакция, возникающая в исследуемом листе (данные не представлены), была незначительной (< 15 мВ). В этих случаях в исследуемом листе отсутствовал как быстрый фотосинтетический ответ, так и изменения транспирации. Такой результат подтверждает ключевую роль ВП для индукции фотосинтетических и транспирационных ответов после нанесения локального ожога, по крайней мере, для быстрой фазы ответа, лежащей в пределах 10 мин после раздражения. В случае более длительных изменений результаты являются менее однозначными, так как некоторое снижение поглощения углекислого газа развивается и в случае прохождения в лист электрических сигналов с небольшой амплитудой. Последнее согласуется с выдвинутой в работах ряда авторов (Peña-Cortés et al., 1995; Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012) гипотезой о том, что стрессовые фитогормоны (в частности, абсцизовая и

жасмоновая кислоты) также могут выступать в качестве дистанционного сигнала, индуцируемого локальными повреждениями и влияющего на фотосинтез интактных листьев. Проверка этой гипотезы, впрочем, осложняется наличием взаимодействия между электрическим и гормональными сигналами, так например, известно, что распространение электрических сигналов может вызывать синтез абсцизовой и жасмоновой кислот и других фитогормонов (Peña-Cortés et al., 1995; Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012).

Анализ связи амплитуды ВП с ответами световой стадии фотосинтеза и ассимиляции CO_2 показал высокие корреляции для всех исследуемых показателей, что подтверждает ключевую роль ВП в развитии ответа (рис. 3.3б).

Обобщая результаты первого блока исследований, можно отметить, что способность локального раздражения индуцировать распространение электрического сигнала и последующие изменения фотосинтеза была продемонстрирована в широком спектре работ (Сухов и др., 2008а, б; Fromm, Eschrich, 1993; Fromm, Fei, 1998; Koziol et al., 2004; Bulychiev et al., 2004; Lautner et al., 2005; Kaiser, Grams, 2006; Hlaváčková et al., 2006; Grams et al., 2007, 2009; Krupenina, Bulychiev, 2007; Krupenina et al., 2008; Pavlovič et al. 2011), однако анализ участия ПД и ВП в фотосинтетическом ответе проводился значительно реже (Fromm, Eschrich, 1993; Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009). В частности, до сих пор дискутируется вопрос, что именно – электрический сигнал или сигналы какой-либо другой природы связывают фотосинтетические процессы в интактных частях растения с зоной стимуляции (Peña-Cortés et al., 1995; Grams et al., 2009).

Полученные нами результаты являются аргументом в пользу ключевой роли распространения ВП в индукции фотосинтетического ответа при нанесении на растение локального повреждения: распространение ВП в лист предшествует началу снижения фотосинтеза, величина переменного потенциала в листе должна превышать определенные значения для индукции ответа, а амплитуда ВП коррелирует с амплитудой ответа. Такие результаты согласуются с данными отдельных работ, в которых показана связь фотосинтетического ответа с параметрами генерации электрического сигнала (Fromm, Eschrich, 1993), а также зависимость начала фотосинтетического ответа от времени, расстояния от зоны повреждения и от

проводящих пучков, которые являются, по-видимому, основным каналом распространения электрических сигналов (Lautner et al., 2005; Grams et al., 2009).

В целом результаты, представленные в этом разделе, показывают, что в большинстве случаев ВП способен проходить в отдалённую от области раздражения часть растения, где при амплитуде сигнала выше порогового уровня (~10–15 мВ) возникает снижение таких параметров, как квантовые выходы фотосистем, фотосинтетическая ассимиляция углекислого газа и транспирация. Этот ответ растения хорошо согласуется с рядом исследований, проведённых на высших растениях (Grams et al., 2009; Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2012), в которых наблюдалось ВП-индуцированное снижение активности фотосинтеза и транспирации. Гипотетическими механизмами индукции быстрого снижения фотосинтетических параметров могут быть вход протонов у высших растений (Сухов и др., 2013а; Шерстнева и др., 2015а, 2015б; Grams et al. 2009, Sukhov et al., 2014) и вход ионов Ca^{2+} у харовых водорослей (Krupenina, Bulychiev, 2007, Krupenina et al., 2008). При этом достаточно вероятным является взаимодействие протонного и кальциевого механизма, так как известно (Vodeneev et al., 2015; Sukhov, 2016), что вход ионов кальция участвует в индукции электрических сигналов путём инактивации протонной АТФазы плазматической мембраны. В свою очередь, инактивация H^+ -АТФазы является, по-видимому, основным механизмом изменения pH во время развития электрических сигналов (Шерстнева и др., 2016б; Sukhov, Vodeneev, 2009; Vodeneev et al., 2015). С другой стороны, долгосрочная инактивация фотосинтеза может быть связана с возрастанием содержания ряда стрессовых фитогормонов, таких как жасмоновая (ЖК) и абсцизовая (АБК) кислоты (Peña-Cortés et al., 1995, Hlaváčková et al., 2006; Hlavinka et al., 2012).

Вопрос о механизмах ответов транспирации исследован в очень ограниченном количестве работ (Koziolek et al., 2004; Grams et al., 2007), в которых его зачастую связывают с распространением гидравлической волны и изменениями гидростатического давления в клетках, окружающих устьица. С другой стороны, хорошо известно (Lawson, 2009; Wang et al., 2014), что открытие/закрытие устьиц может зависеть от активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны. Это показывает существование еще одного потенциального механизма влияния электрических сигналов на устьичную проводимость.

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФОТОСИНТЕЗ И ТРАНСПИРАЦИЮ

4.1. Анализ роли темновой стадии фотосинтеза в формировании вызванного переменным потенциалом фотосинтетического ответа

В соответствии с рядом работ инактивация темновой стадии фотосинтеза может являться одним из первых этапов формирования индуцированного электрическими сигналами ответа фотосинтеза у высших растений (Krupenina, Bulychiev, 2007; Pavlovič et al., 2011, Sukhov et al., 2012; Gallé et al., 2013), который в дальнейшем вызывает изменения процессов световой стадии фотосинтеза, включая снижение квантовых выходов фотосистем и рост нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла фотосистемы II. Проверка этой гипотезы стала задачей следующего этапа работы.

Для снижения активности темновой стадии фотосинтеза мы уменьшали концентрацию основного её субстрата – CO_2 в кювете с исследуемым листом растения до минимальных значений. При этом проводилось исследование как особенностей развития вызванного ВП ответа фотосинтеза в этих условиях, так и непосредственно влияние снижения концентрации углекислого газа на параметры световой стадии фотосинтеза.

ВП-индуцированный фотосинтетический ответ в условиях низкой внешней концентрации CO_2 (приблизительно 15 мкмоль/л) был существенно менее выражен, чем в контрольных условиях (360 мкмоль/л) (рис. 4.1). При этом уменьшение амплитуды быстрой фазы фотосинтетического ответа (первые 10 мин после стимуляции) было наиболее выражено для снижения ассимиляции CO_2 , несколько менее выраженным было уменьшение квантовых выходов фотосистем. Для медленной фазы снижения фотосинтетической активности (15-50 мин после стимуляции) подавление ответа газообмена было еще более выраженным, в то время как для квантовых выходов фотосистемы I и II вызванное ВП уменьшение оставалось существенным. Важно отметить, что в условиях низкой концентрации CO_2 параметры ответа газообмена практически не отличались от ответов дыхания, наблюдаемых у гороха при ВП в условиях темноты (см. раздел 6.3). Это показывает, что снижение концентрации углекислого газа действительно полностью подавляло ответ темновой стадии фотосинтеза. В целом, результаты этого блока экспериментов показывают, что

инактивация темновой стадии фотосинтеза, по-видимому, вносит существенный вклад в развитие ответа световой стадии при ВП, однако даже в условиях полного подавления такого ответа в условиях низкой концентрации CO_2 наблюдается некоторое снижение процессов световой стадии. Такие результаты позволяют предположить, что влияние ВП на фотосинтез высшего растения может быть реализовано двумя (или более) путями, один из которых связан с темновой стадией фотосинтеза, а другой (другие) – с влиянием переменного потенциала на световую стадию. Это предположение согласуется с отдельными экспериментальными работами, в которых была показана возможность влияния электрических сигналов на световую стадию фотосинтеза без участия темновой (Sukhov et al., 2012, 2014; Vredenberg, Pavlovič, 2013).

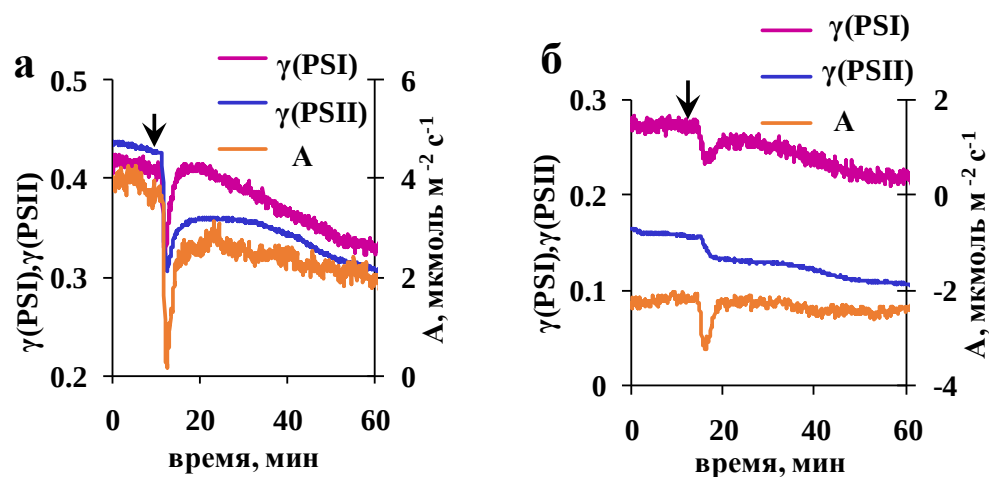


Рис. 4.1. Изменения уровня ассимиляции CO_2 и параметров световой стадии фотосинтеза ($\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$), вызванные локальным ожогом (стрелка) ($n=5-13$); конечный уровень ассимиляции CO_2 при нормальной, 360 $\mu\text{mol/L}$ ($n=7$, а), и низкой, 15 $\mu\text{mol/L}$ ($n=11$, б) концентрации CO_2 .

Для дополнительной проверки роли инактивации темновой стадии в развитии фотосинтетического ответа проводилось исследование динамики показателей световой стадии в условиях снижения концентрации CO_2 , т.е. при имитации подавления фиксации углекислого газа фотосинтезом. Было показано (рис. 4.2), что снижение активности темновой стадии фотосинтеза при различных значениях концентрации CO_2 вызывало уменьшение квантовых выходов фотосистемы I и II, причем величина такого уменьшения зависела от величины снижения концентрации углекислого газа. Наблюдаемые изменения были качественно и количественно сопоставимы с изменениями параметров световой стадии фотосинтеза, вызванными ВП, что является дополнительным аргументом в пользу участия темновой стадии в формировании ответа фотосинтеза.

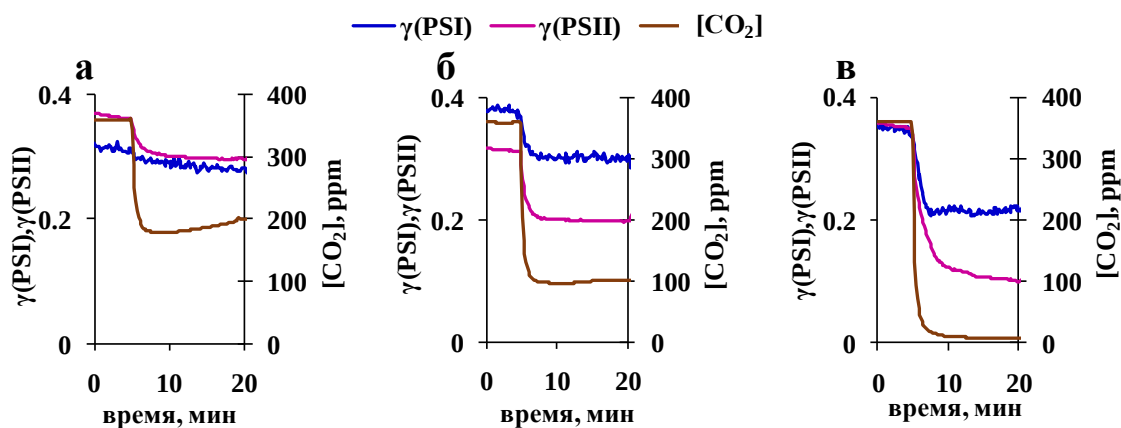


Рис. 4.2. Типичные записи изменений параметров световой стадии фотосинтеза ($\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$), вызванные снижением внешней концентрации CO_2 до различных значений: 200 ppm (а), 100 ppm (б) и 10 ppm (в), исходное значение концентрации CO_2 360 ppm ($n = 5-13$).

Важно отметить, что практически полное подавление развития вызванного ВП ответа газообмена не приводило к полному подавлению изменений параметров световой стадии фотосинтеза. Это позволяет заключить, что фотосинтетический ответ может включать в себя несколько компонент, одна из которых связана со снижением активности темновой стадии фотосинтеза, а другие – нет. Дополнительным аргументом в пользу существования не связанных с инактивацией темновой стадии фотосинтеза компонент является несоответствие динамики изменений газообмена и параметров световой стадии, в первую очередь – изменения квантового выхода фотосистемы I (см. рис. 3.3, раздел 3.2).

Представленные результаты подтверждают гипотезу о том, что инактивация темновой стадии фотосинтеза представляет собой один из наиболее ранних этапов ВП-индуцированного фотосинтетического ответа (Сухов и др., 2008а, б; Krupenina, Bulychев 2007; Krupenina et al., 2008; Pavlovič et al., 2011). Согласно этой гипотезе электрические сигналы снижают активность протекания темновой стадии фотосинтеза, что приводит к накоплению продуктов световой стадии и росту соотношения АТФ/АДФ и НАДФН₂/НАДФ⁺. Следствием увеличения НАДФН₂/НАДФ⁺ является затруднение оттока электронов с ферредоксина через ферредоксин-НАДФ-редуктазу, т.е. снижение нециклического потока электронов и уменьшение квантовых выходов фотосистем. С другой стороны, увеличение АТФ/АДФ должно снижать поток протонов через H⁺-АТФ-синтазу тилакоидной мембраны и, как следствие, приводить к росту градиента рН на ней. Окисление пластохинолов в люмене тилакоидов является одним из лимитирующих

этапов световой стадии фотосинтеза и может существенно замедляться при закислении люмена (Tikhonov, 2013, 2014). Кроме того, влияние закисления люмена может реализовываться и через усиление нефотохимического тушения флуоресценции фотосистемы II, которое также индуцируется низким pH люмена (Шерстнева и др., 2015a; Шерстнева и др., 2016; Сухов и др., 2013б; Maxwell, Johnson 2000; Müller et al. 2001; 2014a). Наконец, потенциально возможным представляется и влияние ВП на функционирование ферредоксин-НАДФ-редуктазы, так как позиция этого фермента и, соответственно, его активность зависят от pH стромы (Alte et al., 2010; Benz et al., 2010), который, в свою очередь, может при ВП снижаться за счет закисления цитоплазмы (Сухов и др., 2013б; Sukhov et al., 2014a; Sherstneva et al. 2015, 2016).

Вопрос о механизмах влияния ВП на темновую стадию фотосинтеза остается дискуссионным. Согласно работе Gallé et al. (2013), такой механизм связан со снижением поступления углекислого газа в строму хлоропластов. Логично предположить, что это снижение может быть обусловлено закрытием устьиц, которое наблюдается при распространении электрических сигналов. Однако наши результаты показывают, что динамика снижения устьичной проводимости может существенно отличаться от динамики изменений газообмена. В частности выявлено, что снижение транспирации начинается позже, нежели снижение газообмена, а дальнейшая динамика процессов также может различаться (рис. 3.3). Другие возможные пути влияния ВП на темновую стадию могут быть связаны с уменьшением проводимости клеток мезофилла для CO₂ (Gallé et al., 2013), а также инактивацией ферментов цикла Кальвина, так как их активность зависит от pH стромы (Wolosiuk et al., 1993).

Таким образом, полученные результаты показывают, что у гороха имеются различные механизмы влияния ВП на фотосинтез. Один из них схож с механизмом, участвующим в развитии вызванного ПД ответа у венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*) (Pavlovič et al., 2011), и связан со снижением активности темновой стадии фотосинтеза, другие механизмы, по-видимому, с влиянием ВП на световую стадию фотосинтеза.

4.2. Влияние инактивации H⁺-АТФазы на транспирацию

На следующем этапе был проведен анализ возможных механизмов влияния ВП на водную проводимость листа. Известно, что переходная инактивация H⁺-АТФазы является основным механизмом генерации ВП (Stahlberg et al., 2006), а активность этого

транспортера регулирует открытость устьиц (Lawson, 2009; Wang et al., 2014). На основании этого можно предположить, что инактивация протонной помпы при индукции ВП будет влиять на степень открытости устьиц, а следовательно, и потерю воды листом растения при прохождении ВП.

Для выяснения механизмов снижения транспирации, показанного в предыдущем блоке работы, проводилась обработка листьев специфическим ингибитором H^+ -АТФазы ортованадатом натрия (ОВ, 0,5 мМ). Из рис. 4.4а видно, что ОВ снижал амплитуду ВП. Это может быть обусловлено тем, что значительный вклад в формировании этого сигнала вносит именно метаболическая компонента (Оприатов и др., 1991). Кроме того, ОВ вызывал небольшое, но достоверное снижение исходного уровня транспирации (рис. 4.4б) и существенное (~3 раз) подавление индуцированного ВП уменьшения скорости транспирации (рис. 4.4в).

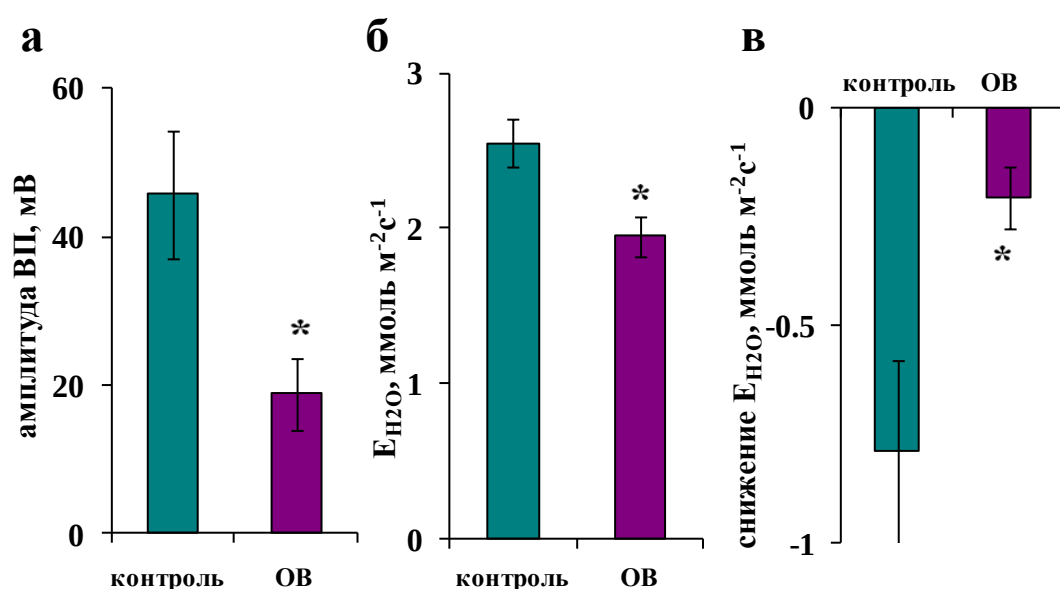


Рис. 4.4. Влияние 0,5 мМ ортованадата натрия (ОВ) на амплитуду переменного потенциала в листьях (а), на уровень транспирации (б) и на снижение транспирации при ВП (в), $n = 6$; * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Таким образом, индуцированное ВП снижение транспирации может быть связано с инактивацией H^+ -АТФазы, которая является основным механизмом генерации ВП (Stahlberg et al., 2006). В целом эти результаты подтверждают ключевую роль инактивации H^+ -АТФазы в ВП-индуцированном уменьшении транспирации и хорошо соответствуют данным относительно участия H^+ -АТФазы в регуляции открытия устьиц (Lawson, 2009; Wang et al., 2014).

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА К ДЕЙСТВИЮ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

5.1. Влияние переменного потенциала на устойчивость фотосинтетического аппарата и растения в целом

На следующем этапе было исследовано влияние ВП на устойчивость фотосинтетического аппарата к высокой температуре. Результаты анализа влияния ВП на устойчивость ФСІ и ФСІІ при нагревании листьев до различных температур приведены на рис. 5.1. Конечные квантовые выходы $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ достоверно не отличались у обработанных и контрольных листьев при температуре листа в диапазоне от 43°C до примерно 44–45°C; тем не менее окончательный $\gamma(\text{PSI})$ после распространения ВП был значительно выше, чем в контрольной группе после нагрева листа до 47°C. Таким образом, было показано положительное влияние ВП на устойчивость ФСІ к нагреванию при температуре 45–47°C или более. Температура листа $T_{\text{л}} = 46^\circ\text{C}$ была использована в последующих экспериментах.

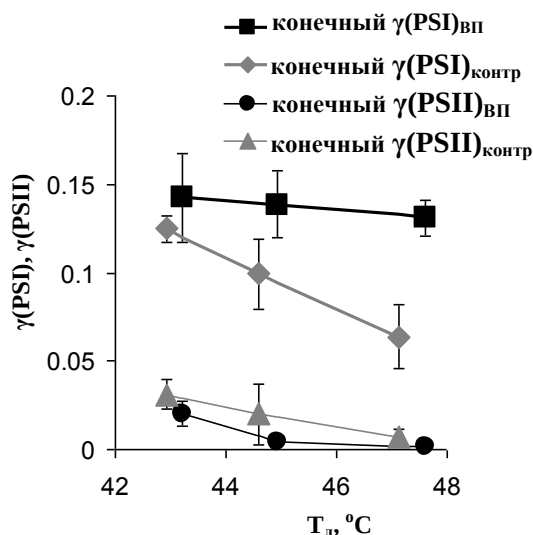


Рис. 5.1. Конечный $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ и температуры листа при нагревании через 15 мин после распространения ВП ($n = 4$). $T_{\text{л}}$ при нагревании рассчитывалась как средняя температура с 10 до 30 мин после начала нагрева.

Влияние ВП на степень повреждения фотосинтетического аппарата анализировалось при нагревании листа до 46°C (рис. 5.2), что было достигнуто с использованием специализированного режима работы GFS-3000, позволяющего

поддерживать заданную температуру листа. Было показано, что конечные квантовые выходы $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ существенно снижались, а уровень ассимиляции CO_2 (A) был полностью подавлен в контроле без индукции ВП. Значительная доля ФСИ (0,80) и ФСII (0,88) была повреждена при нагревании. При этом меньшее повреждение ФСИ по сравнению с ФСII хорошо согласуется с сильной чувствительностью ФСII к нагреванию в диапазоне 40-50°C и слабому подавлению активности ФСИ при этих температурах у гороха (Oukarroum et al., 2013). Доля неповрежденной ФСII (0,12), была сходна с таковой у тыквы после нагревания до 45°C (Ретивин и др., 1999а).

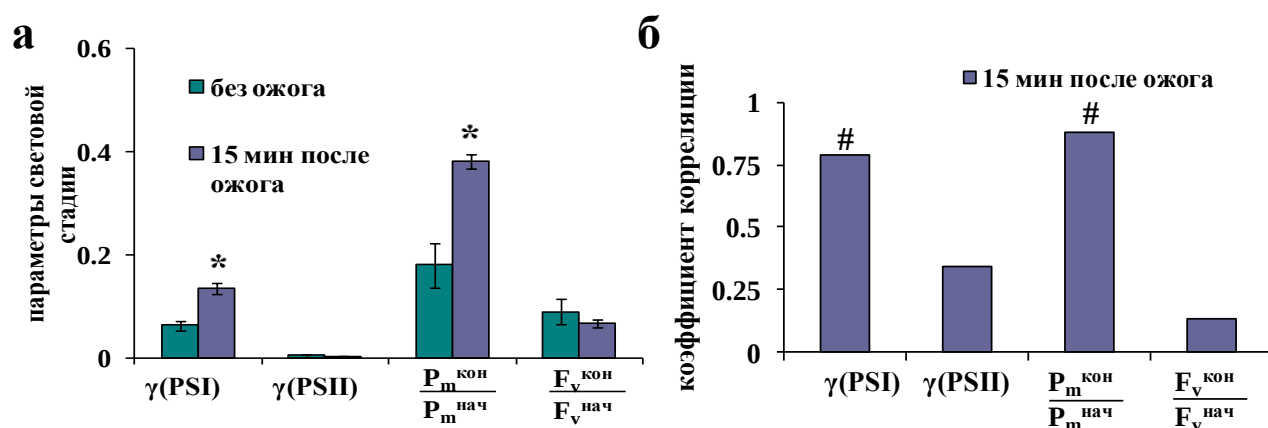


Рис. 5.2. Фотосинтетические параметры после 30 мин прогрева, при температуре листа 46°C в контроле и через 15 мин после прохождения ВП в лист; конечные $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ и доли неповреждённых фотосистем I и II при нормальной концентрации внешнего CO_2 (а); коэффициенты корреляции между относительной величиной ВП-индуцированного снижения A и параметрами фотосинтеза после нагревания, $n=7-9$ (б); * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$); # – коэффициент корреляции достоверен ($p < 0,05$).

Индукция ВП за 15 минут перед нагревом и последующее распространение его в лист увеличивало конечный $\gamma(\text{PSI})$ и долю неповрежденной ФСИ (от 0,20 до 0,38), что показывало положительное влияние переменного потенциала на устойчивость фотосистемы I. В то же время $\gamma(\text{PSII})$ и доля неповрежденной ФСII в обработанных листьях существенно не отличались от таковых у контрольных растений, что свидетельствует об отсутствии повышения устойчивости фотосистемы II после распространения ВП. Ассимиляция CO_2 оставалась практически полностью подавленной в этих условиях, что может быть связано с очень существенным температурным стрессом, который испытывало растение.

Для исследования связи обнаруженного повышения устойчивости фотосинтетического аппарата был использован корреляционный анализ. Показано, что

коэффициенты корреляции между относительной величиной ВП-индуцированного снижения A и параметрами фотосинтеза после нагрева были высокими и значимыми для конечного $\gamma(\text{PSI})$ ($r = 0,79$) и для доли неповрежденной ФСИ ($r = 0,88$) (рис. 5.2б). В то же время остаточные параметры фотосистемы II были практически не связаны с величиной снижения ассимиляции углекислого газа. Так коэффициенты корреляции между снижением A и $\gamma(\text{PSI})$ и между снижением A и долей неповрежденной ФСII были небольшими и недостоверными ($r = 0,34$ и $r = 0,13$ соответственно) (рис. 5.2б). Такой результат является аргументом в пользу участия вызванного ВП фотосинтетического ответа в формировании повышения устойчивости ФСИ к высокой температуре. Более подробно этот вопрос будет проанализирован в разделе 5.2.

В одном случае из десяти ВП не проходил в исследуемый лист, и фотосинтетического ответа не наблюдалось. При этом фотосинтетические параметры после прогрева существенно не отличались от контрольных (данные не представлены). Данные, полученные с таких растений, в дальнейшем анализе не учитывались. Само наличие таких растений дополнительно показывает, что распространенное ВП в лист является необходимым условием для формирования повышенной теплоустойчивости фотосинтетического аппарата после нанесения на растение локального ожога.

Был проведен более детальный анализ динамики повреждения фотосистем I и II при действии высокой температуры на растения в контроле и после индукции ВП. При этом для большего соответствия с действием высокой температуры в естественных условиях нагрев осуществлялся до заданной температуры воздуха в кювете (53°C), в то время как температура листа измерялась, однако искусственно не выравнивалась у опыта и контроля. Для этого использовали режим работы GFS-3000, поддерживающий постоянную температуру кюветы.

Рис. 5.3 показывает влияние ВП на повреждение ФСИ и ФСII при действии высокой температуры. При этом в динамике показателей $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ при нагревании после ВП наблюдались существенные отличия от контрольной группы (рис. 5.3а-в). Было показано, что ВП ускорял снижение $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ на начальной стадии прогрева, однако последующие динамики для ФСИ и ФСII были различны. $\gamma(\text{PSI})$ стабилизировался и его величина сразу после окончания нагрева и через 10 мин после завершения действия повышенной температуры были больше, чем в контрольной группе (рис. 5.3г,д). Остаточная доля неповрежденных ФСИ ($P_{\text{м}}^{\text{кон}}/P_{\text{м}}^{\text{нач}}$) после

прохождения ВП также существенно превышала аналогичную долю у контрольных растений. $\gamma(\text{PSII})$ сразу после окончания нагревания и через 10 мин после этого, а также доля неповрежденной ФСИ ($F_v^{\text{кон}}/F_v^{\text{нач}}$) были ниже, чем в контрольной группе растений (рис. 5.3е). Важно отметить, что положительное влияние ВП на устойчивость ФСИ и отрицательное – на устойчивость ФСИ наблюдалось на двух исследованных временных диапазонах (через 15 мин и 45 мин после индукции электрического сигнала).

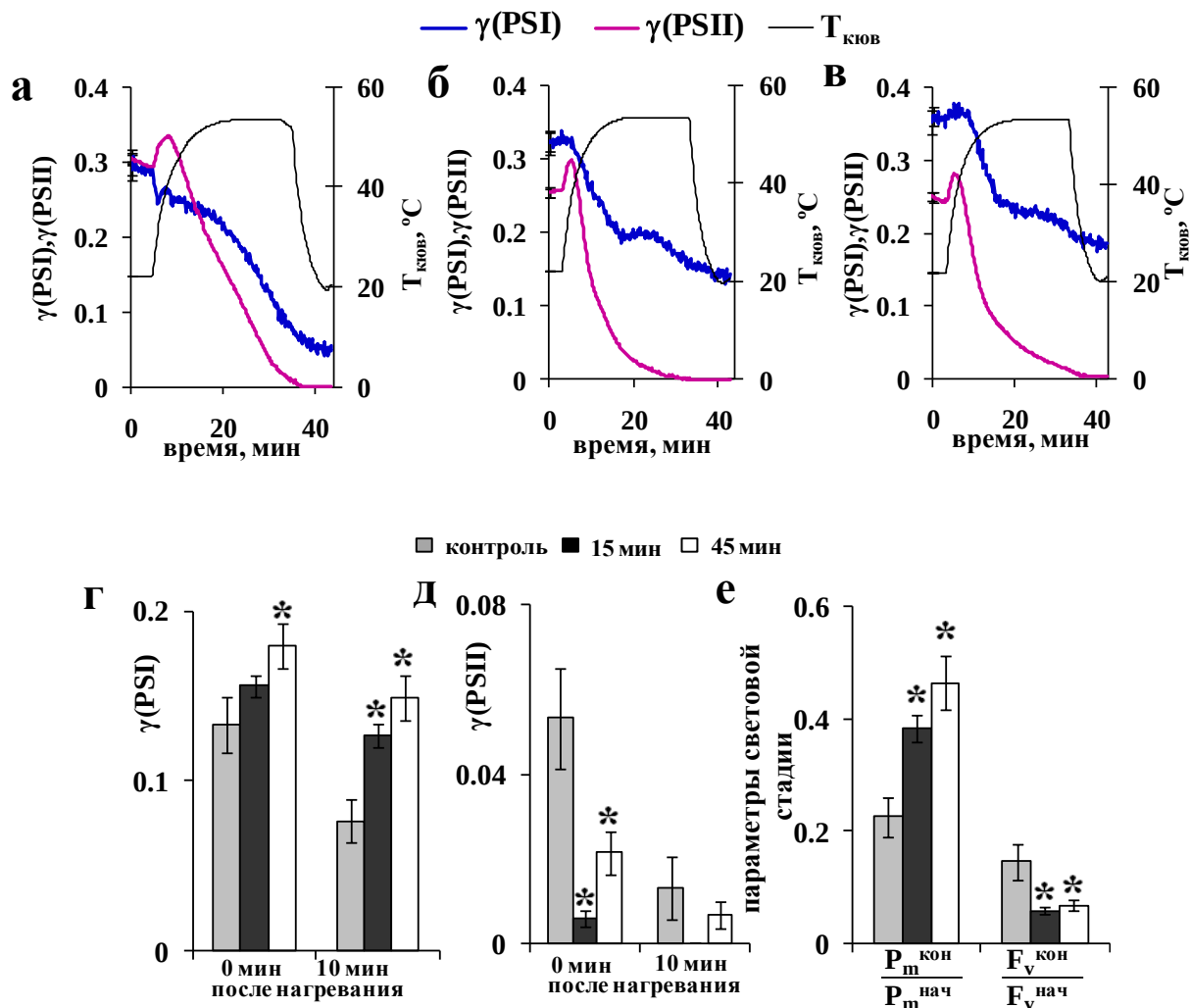


Рис. 5.3. Типичные записи фотосинтетических параметров ($\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$) и температуры кюветы ($T_{\text{кюв}}$), при прогреве листа без ВП ((а), $n = 8$), через 15 мин после генерации ВП ((б), $n = 6$), через 45 мин после генерации ВП ((в), $n = 5$). Величины $\gamma(\text{PSI})$ после нагревания в контрольной и экспериментальной группе (г). Величины $\gamma(\text{PSII})$ после нагревания в контрольной и экспериментальной группе (д). Отношение конечного максимального изменения сигнала P_{700} к первоначальному максимальному изменению P_{700} ($P_m^{\text{кон}}/P_m^{\text{нач}}$) и отношение конечной переменной флуоресценции к начальной переменной флуоресценции ($F_v^{\text{кон}}/F_v^{\text{нач}}$) после нагрева в контрольной группе и в эксперименте (е). $T_{\text{кюв}}$ во время нагрева повышалась до 53°C, длительность 30 мин. * – сравнение с контрольной группой ($p < 0,05$).

Показанное в этой серии экспериментов положительное влияние ВП на устойчивость ФСІ хорошо согласуется с результатами нашего предыдущего этапа работ. Вероятно, оно обусловлено инактивацией темновой стадии фотосинтеза. В то же время вызванное распространением ВП усиление повреждения ФСІІ на предыдущем этапе исследования выявлено не было. Логично предположить, что такой эффект связан с различиями в температурном режиме в проведенных сериях экспериментов и может быть связан с особенностями нагрева листа в контроле и после распространения ВП. Этот вопрос будет более детально проанализирован в разделе 5.3.

Далее оценивалось влияние ВП на устойчивость к высокой температуре у целого растения. Предпосылкой для этого являются немногочисленные данные литературы о том, что ЭС способны повышать устойчивость растений к стрессорам. Так, Ретивиным с соавторами (1997, 1999) было показано положительное влияние ПД на устойчивость растений к стрессовым факторам, в частности, к охлаждению, а также была показана способность ЭС снижать повреждение ФСІІ при охлаждении и прогреве. Полученные в настоящем исследовании результаты являются более противоречивыми, так как ВП уменьшал повреждение ФСІ и одновременно стимулировал повреждение ФСІІ при нагревании. В результате итоговое влияние ВП на устойчивость целого растения к воздействию высоких температур может быть как положительным, так и отрицательным, что делает актуальным его исследование.

Для оценки воздействия ВП на устойчивость растения в целом было исследовано его влияние на ростовые процессы. Для этого 13-дневные проростки гороха были подвергнуты получасовому прогреву в воздушном термостате. В контрольной серии экспериментов какие-либо предварительные воздействия на растения отсутствовали. В двух опытных сериях экспериментов предварительно осуществлялся ожог листа. При этом временной интервал между ожогом листа и нагревом целого растения в одном случае составлял 15 мин, а в другом – 45 мин. В дальнейшем прогретые растения выращивали в течение 5 дней, после чего у 17-дневных проростков осуществлялось измерение длины стебля и корня. В двух отдельных сериях контрольных экспериментов были определены длины стебля и корня у 13- и 17-дневных проростков, не подвергавшихся действию общего нагрева.

В результате экспериментов было показано, что получасовой нагрев растения до 51°C существенно снижал темпы роста побега и корня, нагревание до 53°C и 55°C

полностью подавляло ростовые процессы в контрольной группе растений с прогревом, но без раздражения (рис. 5.4). Индукция ВП за 15 мин до нагревания растения не влияла на рост после повышения температуры до 51°C и никак не меняла полное подавление ростовых процессов после повышения температуры до 55°C, однако предварительная индукция ВП позволяла сохранить процесс роста стебля и корня после нагревания до 53°C. Полное подавление роста растений в контрольной группе после нагрева до 53°C и умеренный рост стеблей и корней у экспериментальных растений показали, что ВП уменьшал индуцированное нагревом повреждение у гороха на уровне целого растения. При анализе влияния прогрева на рост при 45-минутном интервале между индукцией ВП и нагревом целого растения было показано схожее изменение морфометрических параметров. Так, общая длина проростков гороха подавлялась меньше при нагревании до 53°C в условиях генерации ВП.

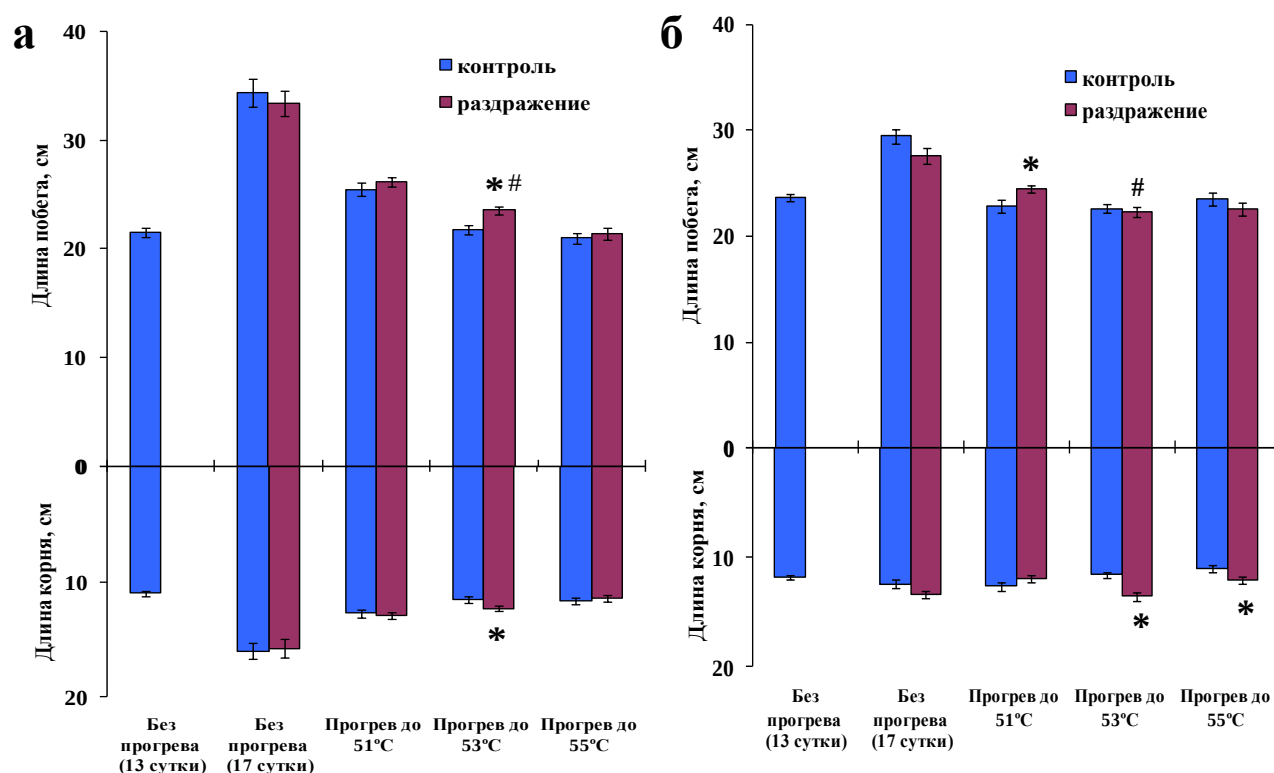


Рис. 5.4. Средние морфометрические параметры после теплового воздействия (нагревание растения до 51°C, 53°C, 55°C): (а) – через 15 мин после индукции переменного потенциала ($n=24-60$); (б) – через 45 мин после индукции переменного потенциала ($n=24-72$); * – $p < 0,05$ для сравнения длины побега и корня с контролем; # – $p < 0,05$ для сравнения общей длины проростка с контролем.

Выявленное влияние ВП на ростовые процессы растений после действия на них повышенной температуры показывает, что электрический сигнал может увеличить

устойчивость растений к воздействию высоких температур, и повреждение ФСII не влияет на этот эффект. Известно, что ФСI более устойчива к стрессовым факторам, чем ФСII (Allakhverdiev et al., 2008). На основании этого можно предположить, что защита ФСII, возможно, недостижима при высоких внешних температурах. С другой стороны, ФСI обладает большей устойчивостью к высокой температуре, а значит, повышение её устойчивости является достижимым результатом и может играть важную роль в увеличении общей устойчивости растения. В частности, такое «сохранение» ФСI способствует поддержанию циклического потока электронов (Zhang, Sharkey, 2009; Joliot, Johnson, 2011) и сохранению синтеза АТФ. Нельзя исключать также, что само по себе большее повреждение ФСII при нагреве может являться частью защитного ответа фотосинтетического аппарата, так как известно (Tikkanen, Aro, 2014; Tikkanen et al., 2014), что при уменьшении потока электронов на ФСI с ФСII устойчивость первой возрастает. Это имеет существенное значение, так как ФСI практически не способна к репарации, в то время как ФСII быстро восстанавливается, т.е. потенциальный вклад усиления повреждения фотосистемы II и уменьшения повреждения вследствие этого фотосистемы I может быть достаточно велик (Tikkanen, Aro, 2014; Tikkanen et al., 2014).

Таким образом, результаты этого блока исследований показывают, что распространение ВП может повышать устойчивость ФСI к повышенной температуре, одновременно усиливая повреждение ФСII. Изменения устойчивости фотосинтетического аппарата, по-видимому, вносят вклад в увеличение общей теплоустойчивости растения, которая развивается при ВП. Влияние ВП на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата имеет достаточно длительный характер (не менее 45 минут после индукции ВП), зависит от величины нагрева (проявляется при достаточно сильном нагреве) и, по-видимому, приводит к увеличению теплоустойчивости на уровне целого растения. Предварительный корреляционный анализ показывает, что повышение устойчивости ФСI, по-видимому, обусловлено вызванной ВП инактивацией фотосинтеза. В то же время, большее повреждение ФСII может быть связано с более сильным нагревом листа и большей температурной чувствительностью ФСII, что согласуется со снижением транспирации листьев растения после ВП. Проверке этих гипотез о механизмах влияния ВП были посвящены следующие этапы исследования.

5.2. Анализ роли вызванного ВП фотосинтетического ответа в повышении устойчивости фотосистемы I

Как было показано выше, одним из первых составляющих фотосинтетического ответа на распространение ВП является инактивация темновой стадии фотосинтеза. Для выявления роли вызванного ВП фотосинтетического ответа в модификации устойчивости фотосинтетического аппарата было исследовано влияние ВП на устойчивость фотосистем при сниженной $[CO_2]$, так как на предыдущих этапах нами было показано, что существенное снижение концентрации углекислого газа полностью подавляет вызванную ВП инактивацию темновой стадии фотосинтеза.

Исследование показало, что ВП не повышал устойчивость ФСИ к нагреванию при низкой внешней концентрации CO_2 (рис. 5.5), более того, наблюдалась скорее тенденция к снижению показателей фотосистемы I после прогрева, которая принимала достоверный характер для значений $\gamma(PSI)$ после нагревания, которые были достоверно ниже, нежели в контроле. Такой результат указывает на отрицательное влияние электрического сигнала на устойчивость ФСИ в условиях низкой концентрации CO_2 и подавление развития индуцированной ВП инактивации темновой стадии фотосинтеза. В случае параметров ФСII после прогрева сохранялась тенденция к их снижению после предварительной индукции ВП. Следует отметить, что устойчивость фотосистем в контроле при низкой внешней концентрации CO_2 (рис. 5.5) была достоверно выше, чем в контроле при 360 ppm CO_2 (рис. 5.2).

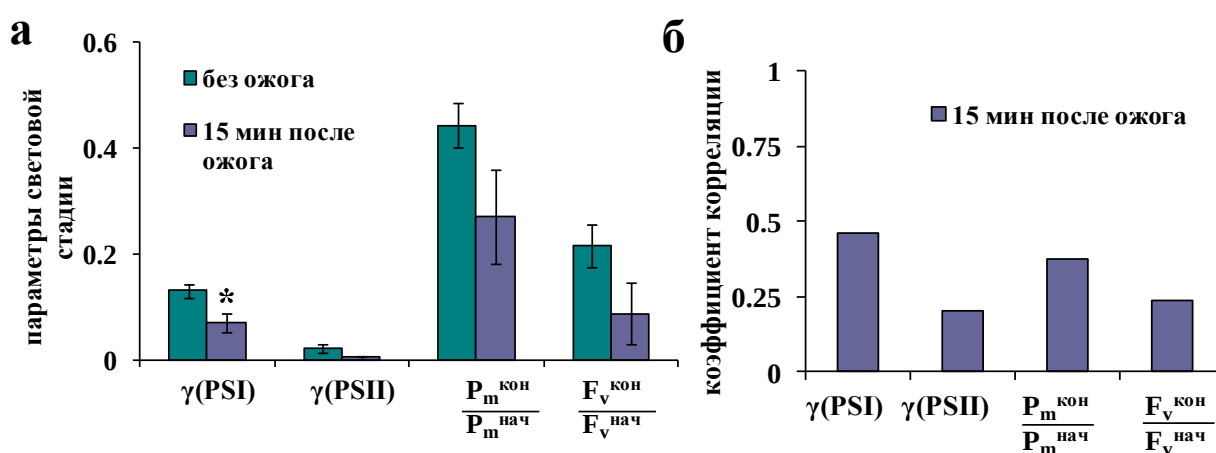


Рис. 5.5. Фотосинтетические параметры после 30 мин прогрева при температуре листа $46^\circ C$ в контроле и через 15 мин после прохождения ВП в лист; конечные $\gamma(PSI)$ и $\gamma(PSII)$ и доли неповреждённых фотосистем I и II при низкой концентрации внешнего CO_2 (15 ppm) (а); коэффициенты корреляции между относительной величиной ВП-индуцированного снижения А и параметров фотосинтеза после нагревания, $n=6$ (б); * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Влияние внешней концентрации CO_2 , которая определяла интенсивность темновой стадии фотосинтеза, на устойчивость фотосистем к нагреванию было проанализировано более подробно. Величины устойчивости ФСИ и ФСII к нагреву и конечные значения внешней концентрации CO_2 , сниженной за 15 мин до начала прогрева, показаны на рис.5.6. Конечный $\gamma(\text{PSI})$ и доля неповрежденной ФСИ увеличивались с уменьшением концентрации CO_2 , а следовательно, и подавлением ассимиляции CO_2 . Конечный $\gamma(\text{PSII})$ и доля неповрежденной ФСII слабо зависели от концентрации CO_2 , однако наблюдалась тенденция к возрастанию устойчивости фотосистемы II при умеренном снижении активности темновой стадии фотосинтеза.

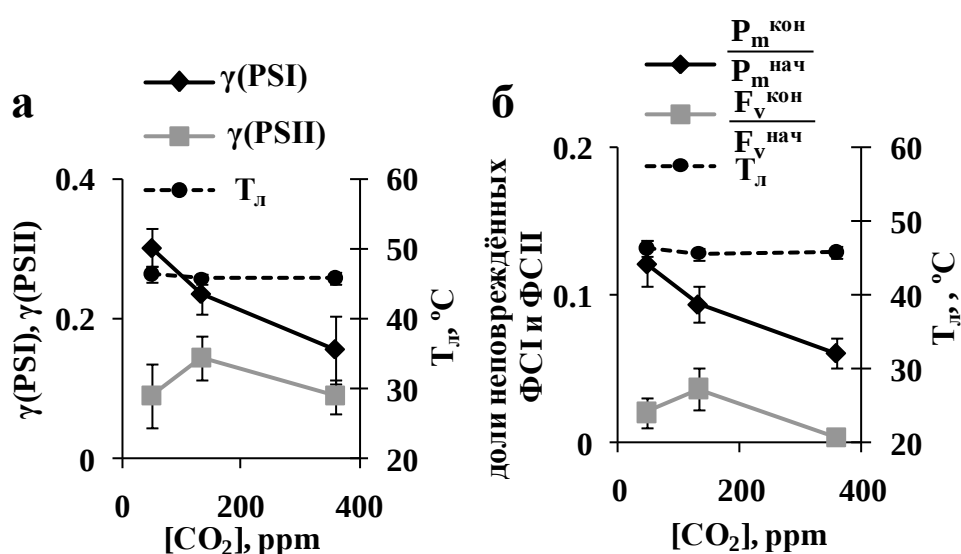


Рис.5.6. Конечные $\gamma(\text{PSI})$ и $\gamma(\text{PSII})$ (а) и доли неповрежденных ФСИ и ФСII (б) после нагревания при различных внешних концентрациях CO_2 ($n = 5-8$). Контрольная начальная концентрация CO_2 360 ppm. Концентрация CO_2 уменьшалась за 15 мин до нагревания.

Ранее Ретивин и др. (1997) предположили, что электрические сигналы могут повышать устойчивость растений к стрессовым факторам. В частности, Ретивин и др. (1999a) показали, что ПД увеличивал устойчивость ФСII к охлаждению (-8°C) и нагреву (45°C), но влияние ВП на устойчивость фотосинтетического аппарата не было исследовано. Из представленных результатов следует, что ВП повышает устойчивость ФСИ к высоким температурам и заметно не влияет на устойчивость ФСII при увеличении T_{pr} до 46°C (рис. 5.2 а).

Такие различия в ответах могут быть связаны с различными влияниями ВП и ПД на устойчивость фотосинтетического аппарата к стрессорам. ВП, который индуцируется

повреждающими раздражителями, вероятно, является сигналом для стрессоров высокой интенсивности в отличие от ПД, который индуцируется неповреждающими раздражителями. Однако ФСІ является более устойчивой к стрессорам, чем ФСІІ (Allakhverdiev et al., 2008; Sharkey, Zhang 2010). Таким образом, ВП-индуцированная защита ФСІ от стресс-фактора высокой интенсивности может быть более эффективной для выживания растений, чем защита ФСІІ.

Конечный γ (PSI) и доля неповрежденной ФСІ были тесно связаны с относительной величиной ВП-индуцированного снижения А (рис. 5.2б). Принимая во внимание этот результат и ключевую роль инактивации темновой стадии в ответе фотосинтеза, индуцированном электрическими сигналами (рис. 4.1., 4.2.; Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2012), можно предположить, что именно эта инактивация цикла Кальвина вызывает увеличение устойчивости ФСІ к нагреванию.

Подавление ВП-индуцированного повышения устойчивости ФСІ к нагреванию при низкой внешней концентрации CO_2 является убедительным доказательством участия инактивации темновой стадии фотосинтеза при ВП в повышении устойчивости ФСІ. Кроме того, повышение устойчивости ФСІ (рис. 5.5), индуцированное снижением концентрации CO_2 за 15 мин до начала прогрева, которое имитировало инактивацию темновой стадии фотосинтеза, и ВП-индуцированное снижение ассимиляции CO_2 дополнительно поддерживают эту гипотезу. Тем не менее, при низкой концентрации CO_2 устойчивость ФСІ повышалась слабее, чем после индукции ВП (рис. 5.2 и 5.5), следовательно, возможны и другие механизмы влияния ВП на устойчивость ФСІ. Прямое влияние электрических сигналов на ФСІ (Sukhov et al. 2012) и ФСІІ (Pavlovič et al. 2011) подтверждает эту возможность.

Кроме того, влияние ВП на устойчивость ФСІ может быть связано с другими физиологическими процессами. В частности известно, что электрические сигналы способны активировать дыхание (Filek, Kościelniak, 1997, Pavlovič et al., 2011, Lautner et al., 2014), которое может быть связано с фотосинтетическими процессами посредством АФК (Foyer, Noctor 2009), АТФ (Noctor, Foyer 2000), внутриклеточной концентрацией CO_2 или другими промежуточными продуктами. Возможные пути влияния ВП на устойчивость фотосинтетического аппарата будут более подробно рассмотрены в главе 6.

5.3. Анализ роли вызванного ВП транспирационного ответа в повышении теплового повреждения фотосистемы II

Механизм ВП-индуцированной стимуляции повреждения ФСII при нагревании требует дополнительного анализа. Принимая во внимание влияние ВП на транспирацию, можно предположить, что ВП может изменить температуру листа при нагревании и тем самым модифицировать повреждение ФСII.

Для проверки этого предположения была исследована роль температуры листа в ВП-индуцированной стимуляции повреждения ФСII при нагревании. Влияние ВП на нагрев листа при одинаковой внешней температуре (53°C) показало, что средняя температура листа с 10 минуты по 30 минуту нагревания была $47,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$, в том случае, когда прогрев начался через 15 мин после ВП. Температура листа была $46,4 \pm 0,6^\circ\text{C}$ в случае, когда нагревание начиналось через 45 мин после индукции электрического сигнала. В то же время она составляла $44,3 \pm 0,7^\circ\text{C}$ у контрольных растений без ВП (рис. 5.7).

Эти различия в температуре листа сопровождались различными измерениями $E_{\text{H}_2\text{O}}$ у экспериментальных и контрольных растений. Растущая внешняя температура существенно стимулировала транспирацию контрольных растений (рис. 5.7 а), величина возрастания $E_{\text{H}_2\text{O}}$ была $22,5 \pm 2,0$ ммоль/м²с. ВП подавлял это возрастание (рис. 5.7 б, в), вследствие чего увеличение $E_{\text{H}_2\text{O}}$ составило $6,1 \pm 1,2$ ммоль/м²с, если нагрев начинался через 15 мин после ВП, и $13,0 \pm 1,2$ ммоль/м²с, если нагрев начинался через 45 мин после индукции электрического сигнала.

Вызванные нагреванием изменения $T_{\text{л}}$ и $E_{\text{H}_2\text{O}}$ хорошо коррелируют между собой ($-0,83$), что подтверждает ключевую роль транспирации для различных вариантов нагрева листьев экспериментальных и контрольных растений при одинаковой внешней температуре.

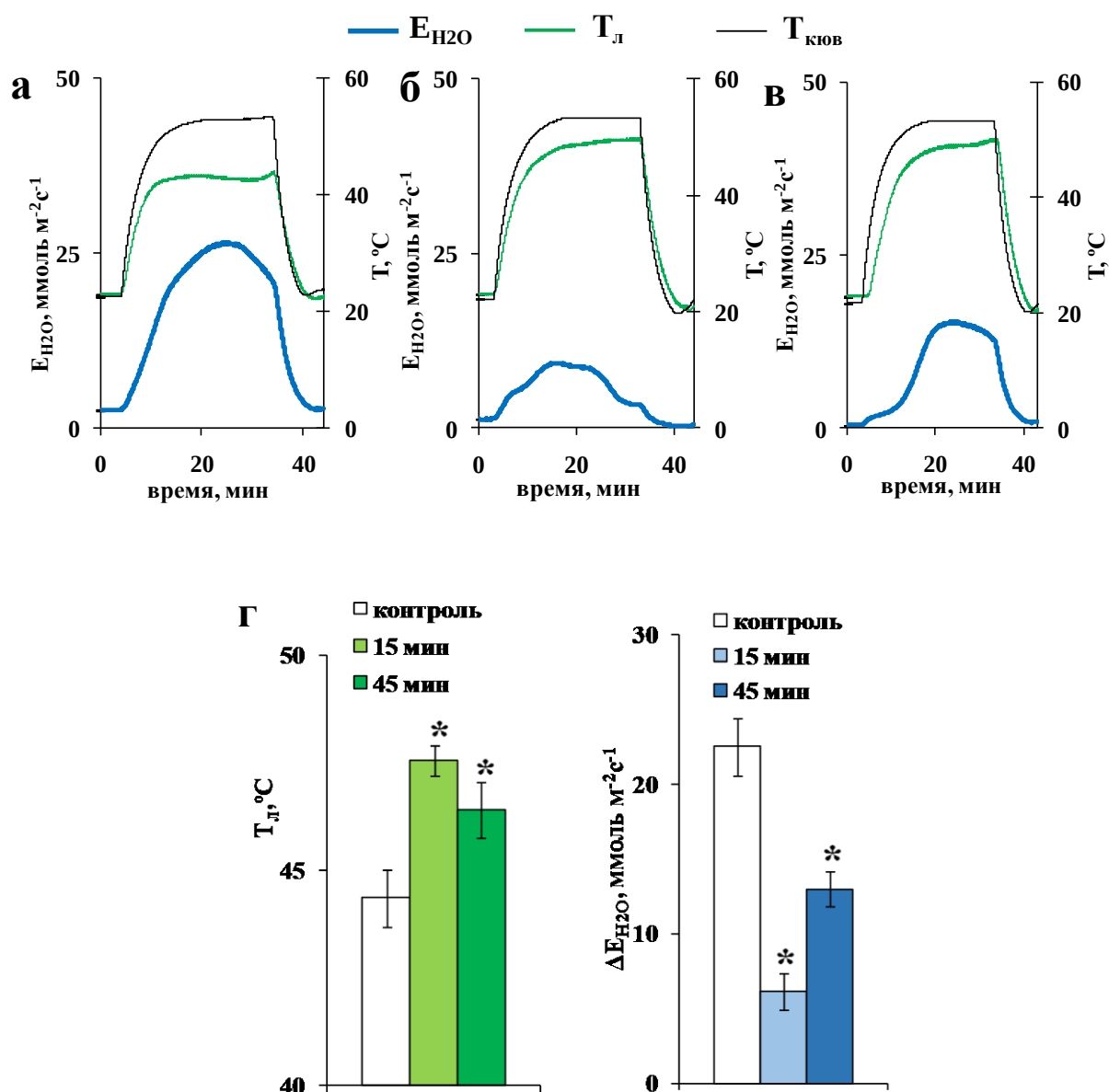


Рис. 5.7. Типичные записи температуры кюветы ($T_{кюв}$), температуры листа (T_l) и транспирации (E_{H_2O}) при прогреве листа без ВП (а), через 15 мин после генерации ВП (б), через 45 мин после генерации ВП (в); средние величины в контроле и после прохождения ВП (г) ($n = 5$).

Диаграммы рассеяния температур листьев гороха и параметров ФСІ и ФСІІ после прогрева показали, что коэффициенты корреляции между температурами и остаточными значениями параметров фотосинтетического аппарата были низкими для ФСІ (–0,13; 0,20; рис. 5.8). В противоположность этому коэффициенты корреляции между температурами листа при нагреве и параметрами ФСІІ после его завершения были достоверными и значительными: –0,72 для T_l и $\gamma(PSII)$ сразу после нагрева, –0,57 для этих параметров через 10 мин после нагрева и –0,69 для T_l и $F_v^{кон}/F_v^{нач}$.

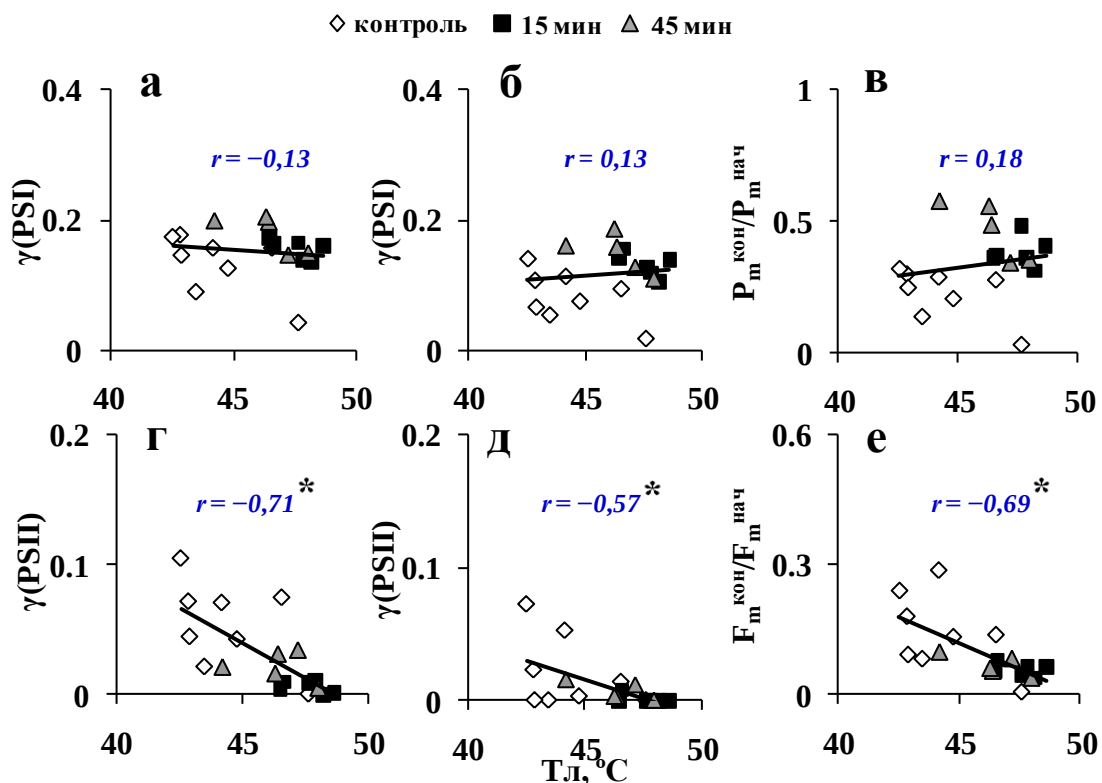


Рис. 5.8. Корреляционные зависимости между средней температурой листа ($T_{\text{л}}$) при высоких внешних температурах и фотосинтетическими параметрами после нагревания у гороха ($n = 19$) измеренными (а, г) сразу после окончания нагрева и (б, д) через 10 минут после прекращения нагрева. Диаграммы рассеяния отношения максимального конечного изменения сигнала P_{700} к максимальному начальному изменению сигнала P_{700} ($P_{\text{м}}^{\text{кон}}/P_{\text{м}}^{\text{нач}}$) (в) и отношения конечной переменной флуоресценции к исходной переменной флуоресценции ($F_{\text{в}}^{\text{кон}}/F_{\text{в}}^{\text{нач}}$) (е) в зависимости от $T_{\text{л}}$. Для анализа использовались как контрольные растения без ВП, так и экспериментальные с ВП, каждая точка соответствует одной повторности. Внешняя температура увеличивалась до 53°C в течение 30 мин нагревания. r – коэффициент корреляции Пирсона. * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Представленные результаты продемонстрировали, что температура листьев у экспериментальных растений была существенно выше, чем в контрольной группе при той же внешней температуре, и что снижение $E_{\text{H}_2\text{O}}$ после ВП, вероятно, является механизмом этого эффекта. ВП-индуцированное понижение транспирации может быть связано с инактивацией H^+ -АТФазы, которая является основным механизмом генерации ВП (Stahlberg et al., 2006). Это предположение подтверждается данными по ингибированию H^+ -АТФазы, описанными в предыдущей главе.

В целом результаты этого блока работ показывают, что более существенный нагрев листа после ВП может играть важную роль в дополнительном повреждении ФСII у растений после индукции переменного потенциала. На фотосистему I такой

дополнительный нагрев не оказывал существенного влияния. Можно предположить, что выявленный эффект является одной из компонент механизма защиты фотосинтетического аппарата (см. выше о связи инактивации ФСII и повышении устойчивости ФСI). С другой стороны, снижение транспирации может быть механизмом, обеспечивающим более высокую теплоустойчивость на уровне целого растения, так как существенная потеря воды может приводить к дополнительному нарушению целостности растения.

Вопрос о реализации связи между изменениями, происходящими в фотосинтетическом аппарате, и повышением устойчивости фотосинтетического аппарата растения требует дальнейшего анализа. Такому анализу посвящён следующий раздел работы.

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИЗМЕНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

6.1. Увеличение циклического потока электронов и рост нефотохимического тушения флуоресценции

Нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) является хорошо известным механизмом защиты ФСII от избыточного света в стрессовых условиях (Müller et al., 2001; Roach, Krieger-Liszkay, 2014), который связан с диссипацией избытка световой энергии в тепло. Важно отметить, что такое механизм может играть защитную роль не только в условиях сильного света, но даже при умеренном освещении – в том случае, если акцептирование электронов нарушено действием того или иного стрессирующего фактора (охлаждение, нагрев и др.). Т.е. увеличение NPQ является достаточно универсальным защитным ответом растения на действие неблагоприятных факторов разной природы.

Другим типичным ответом на действия различных стрессоров является усиление циклического потока электронов вокруг ФСI (Bukhov et al., 1999; Allen, 2003; Rumeau et al., 2007; Zhang, Sharkey, 2009, Sharkey, Zhang, 2010; Johnson, 2011; Sonoike, 2011; Roach, Krieger-Liszkay, 2014). Такое усиление поддерживает транстилакоидную разность pH и синтез АТФ, вносит вклад в регулируемую диссипацию энергии в ФСII, окисляет акцепторную сторону ФСI и контролирует продукцию АФК, таким образом защищая фотосинтетический аппарат.

Вследствие изложенного было изучено влияние ВП на нефотохимическое тушение флуоресценции и циклический поток электронов. Рис. 6.1 показывает, что ВП снижал уровень ассимиляции CO_2 и скорость потока электронов через ФСII, увеличивая при этом NPQ и $\gamma(\text{ND})$, отражающий потери ФСI, связанные с ограничениями донорной стороны этой фотосистемы. При этом показатель $\gamma(\text{NA})$, отражающий потери на акцепторной стороне ФСI, слабо снижался. Реакция EF(C) состояла из двух фаз: быстрая инактивация циклического потока ($\text{EF(C)}_{\text{мин}} - \text{EF(C)}_{\text{нач}}$) и следующая медленная активация ($\text{EF(C)}_{\text{макс}} - \text{EF(C)}_{\text{нач}}$). Максимальное снижение EF(PSII), максимумы быстрой инактивации EF(C) и медленной активации EF(C) наблюдались на $2,8 \pm 0,3$, $1,0 \pm 0,1$ и $5,9 \pm 0,3$ мин, соответственно, после начала фотосинтетического ответа. Быстрая инактивация и медленная активация в контрольных условиях, вероятно, связаны с

независимыми друг от друга процессами, так как коэффициент корреляции (r) между $(EF(C)_{\text{мин}} - EF(C)_{\text{нач}})$ и $(EF(C)_{\text{макс}} - EF(C)_{\text{нач}})$ составлял $-0,07$ ($p > 0,05$).

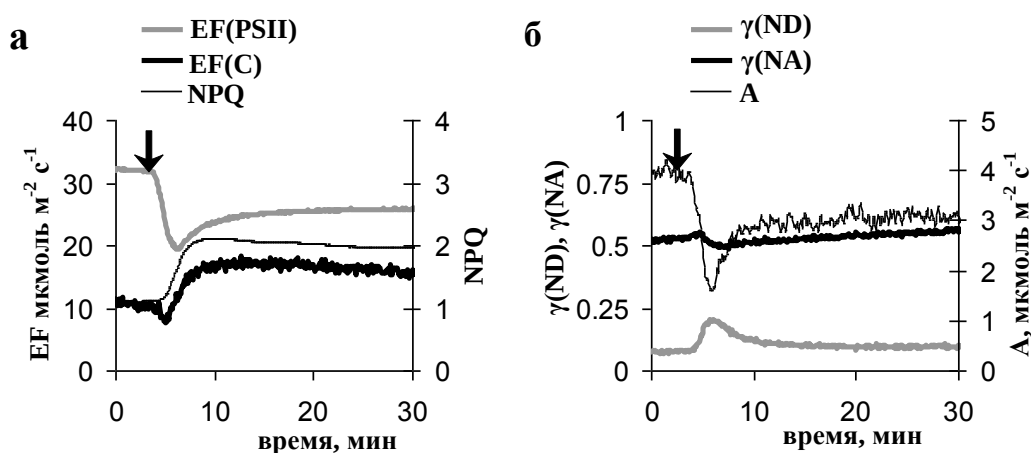


Рис. 6.1. Индуцированные ВП изменения фотосинтетических параметров световой стадии $EF(PSII)$, $EF(C)$, NPQ (а); параметров $\gamma(ND)$, $\gamma(NA)$ и ассимиляции CO_2 (б) в контрольных условиях ($n = 17$). Стрелка – индукция ВП локальным ожогом.

Ответы в $EF(C)$ потенциально могли быть связаны с ВП-индуцированными изменениями в dII . Однако изменения параметра dII должны были приводить к изменению F_m' в условиях слабого освещения, в то же время ВП не оказывал существенного влияния на этот показатель в условиях отсутствия актиничного света, следовательно, изменения dII были незначительны. Эти результаты показывают, что ответ $EF(C)$ не-связан с изменениями dII .

Как было показано на предыдущих этапах работы, инактивация темновой стадии фотосинтеза является начальным процессом ВП-индуцированных фотосинтетических ответов у гороха. Полученные при выполнении данного этапа исследования результаты показали, что индуцированное ВП снижение A и $EF(PSII)$ имеют высокую корреляцию ($r = 0,78$, $p < 0,001$). Искусственное уменьшение активности темновой стадии путём снижения внешней $[CO_2]$ уменьшало $EF(PSII)$ и увеличивало $EF(C)$, $\gamma(ND)$ и NPQ (рис. 6.2а), но быстрая инактивация циклического потока отсутствовала. Кроме того, ВП-индуцированное снижение A и $EF(PSII)$, увеличение $\gamma(ND)$ и NPQ , а также медленная активация $EF(C)$ были меньше в условиях низкой $[CO_2]$ (10–15 ppm), нежели в контрольных условиях (рис 6.2б, табл. 2). В частности, максимум циклического потока ВП не отличался от величины потока до распространения электрического сигнала в этих условиях. Тем не менее, быстрая инактивация циклического потока, вызванного ВП при

низкой $[\text{CO}_2]$ существенно не отличалась от контрольной группы. Следует отметить, что коэффициент корреляции между $(\text{EF}(\text{C})_{\text{мин}} - \text{EF}(\text{C})_{\text{нач}})$ и $(\text{EF}(\text{C})_{\text{макс}} - \text{EF}(\text{C})_{\text{нач}})$ при низкой $[\text{CO}_2]$ составлял $-0,81$ ($p < 0,01$).

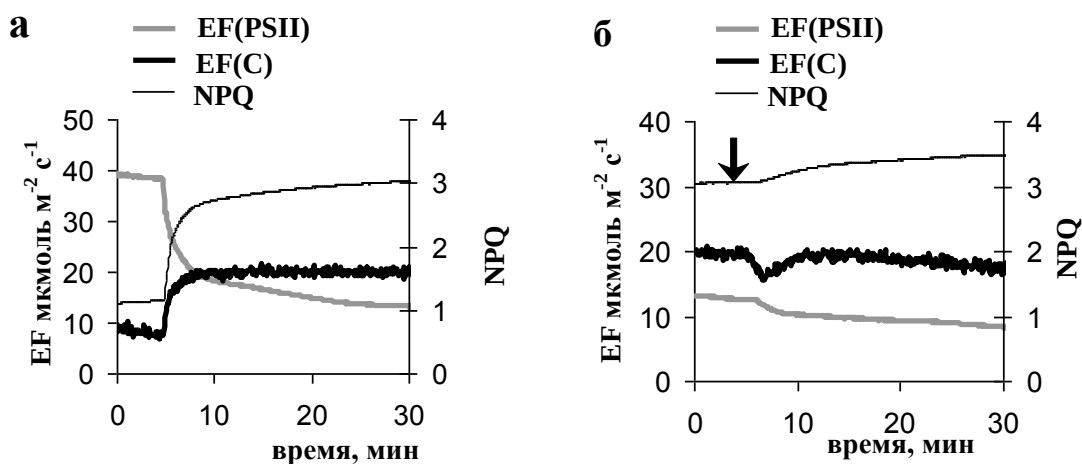


Рис. 6.2. Вызванные снижением $[\text{CO}_2]$ до 10–15 ppm изменения фотосинтетических параметров световой стадии EF (PSII), EF (C) и NPQ и ассимиляции CO_2 ($n = 9-10$) (а); индуцированные ВП изменения фотосинтетических параметров световой стадии EF (PSII), EF(C) и NPQ и ассимиляции CO_2 в условиях низкой $[\text{CO}_2]$ ($n = 11$) (б).

Изменения в EF(PSII) и EF(C) могут быть различными этапами одного вызванного ВП ответа фотосинтеза. Эта гипотеза проверялась с помощью анализа, который показал корреляции между изменениями фотосинтетических параметров. Были выявлены сильные связи между индуцированным ВП или снижением $[\text{CO}_2]$, уменьшением потока электронов через ФСII и медленной активацией циклического потока электронов в контрольных условиях ($r = -0,89$). Корреляция между уменьшением EF(PSII) и быстрой инактивацией EF(C) оказалась незначительной ($r = 0,11$). При низкой $[\text{CO}_2]$ ВП-индуцированные реакции EF(PSII) и EF(C) были слабо связаны друг с другом ($r = -0,15$ и $r = -0,04$).

Исследование изменений относительного циклического потока электронов, индуцированных ВП или снижением $[\text{CO}_2]$, показало, что при ВП в контроле и при низкой $[\text{CO}_2]$, а также при снижении $[\text{CO}_2]$ происходит увеличение относительного потока электронов (табл. 3). Этот эффект наблюдался даже если абсолютное значение EF(C) не показывало каких-либо изменений (фотосинтетический ответ, вызванный ВП при низкой $[\text{CO}_2]$).

Усиление NPQ является механизмом воздействия циклического потока электронов на устойчивость растений к стресс-факторам (Zhang, Sharkey, 2009; Joliot, Johnson, 2011). Рис. 6.3 показывает, что EF(C) и NPQ линейно связаны между собой.

Таблица 2

	ВП	Снижение [CO ₂] до 10–15 мкмоль/моль	Снижение [CO ₂] до 150 мкмоль/моль	ВП при [CO ₂]= 15 мкмоль/моль
<i>n</i>	17	9	10	11
A _{нач} , мкмоль/м ² с	3,34 ± 0,26	2,86 ± 0,45	2,94 ± 0,40	–1,04 ± 0,39
A _{мин} , мкмоль/м ² с	1,39 ± 0,31	–1,22 ± 0,37	1,04 ± 0,33	–2,12 ± 0,47
A _{мин} – A _{нач} , мкмоль/м ² с	–1,95 ± 0,19*	–4,08 ± 0,3*	–1,91 ± 0,20*	–1,03 ± 0,15*
EF(PSII) _{нач} , мкмоль/м ² с	30,1 ± 1,2	33,1 ± 2,2	34,3 ± 1,3	13,7 ± 1,4
EF(PSII) _{мин} , мкмоль/м ² с	23,6 ± 1,1*	13,5 ± 1,6*	25,9 ± 1,1*	8,1 ± 1,0*
EF(PSII) _{мин} – EF(PSII) _{нач} , мкмоль/м ² с	–6,5 ± 0,7*	–19,7 ± 1,3	–8,3 ± 0,9*	–5,5 ± 0,8*
EF(C) _{нач} , мкмоль/м ² с	11,1 ± 1,4	11,7 ± 2,3	11,3 ± 1,9	18,1 ± 1,2
EF(C) _{мин} , мкмоль/м ² с	8,6 ± 1,2	11,7 ± 2,3	11,1 ± 1,8	15,0 ± 1,2*
EF(C) _{макс} , мкмоль/м ² с	14,4 ± 1,1*	20,0 ± 1,6*	15,3 ± 2,1*	18,6 ± 1,3
EF(C) _{мин} – EF(C) _{нач} , мкмоль/м ² с	–2,6 ± 0,3*	0	–0,2 ± 0,1	–3,1 ± 0,4*
EF(C) _{макс} – EF(C) _{мин} , мкмоль/м ² с	5,8 ± 0,4*	8,3 ± 1,1*	4,2 ± 0,5	3,6 ± 0,5*
γ(ND) _{нач}	0,081 ± 0,009	0,071 ± 0,016	0,048 ± 0,006	0,202 ± 0,025
γ(ND) _{макс}	0,142 ± 0,011*	0,182 ± 0,014*	0,100 ± 0,012*	0,253 ± 0,021*
γ(ND) _{макс} – γ(ND) _{нач}	0,061 ± 0,008*	0,111 ± 0,010*	0,035 ± 0,006*	0,051 ± 0,009*
NPQ _{нач}	1,16 ± 0,05	1,25 ± 0,14	1,29 ± 0,09	2,76 ± 0,14
NPQ _{макс}	1,97 ± 0,08*	2,69 ± 0,17*	1,89 ± 0,14*	3,44 ± 0,16*
NPQ _{макс} – NPQ _{нач}	0,81±0,06*	1,34±0,11*	0,57±0,08*	0,68±0,13*

* – различия с контролем достоверны (p < 0,05).

Связь между относительным циклическим потоком электронов и нефотохимическим тушением флуоресценции хлорофилла наблюдалась и в

контрольных условиях. Коэффициент корреляции между EF(C) и NPQ составлял 0,64 ($n = 36$, $p < 0,001$).

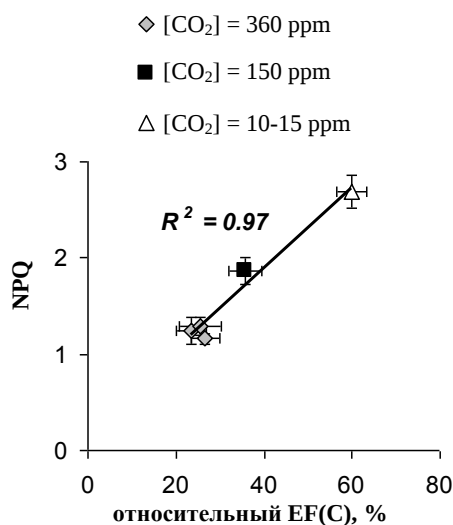


Рис. 6.3. Зависимость величины уровня нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) и относительного циклического потока электронов (относительный EF (C)) при различных концентрациях CO₂ ($n = 36$). R^2 – коэффициент детерминации.

Представленные результаты показывают, что ВП, распространяющийся в лист, индуцирует изменения в фотосинтетических потоках электронов (рис 6.1). ВП-индуцированное уменьшение EF(PSII) хорошо соответствует данным относительно снижения γ (PSII), вызванного электрическими сигналами (см. выше). Тем не менее, изменения в EF(C), которые включают быструю инактивацию циклического электронного потока и его последующую медленную активацию, не были ранее показаны и требуют детального анализа.

Наблюдалась медленная активация циклического потока электронов, индуцированная ВП и снижением [CO₂], что может быть связано с уменьшением EF(PSII) и эта связь опосредована увеличением γ (ND) (табл. 3). Низкая активность темновой стадии фотосинтеза и нециклического потока электронов, как известно, сопровождается высоким EF(C) (Joliot, Joliot, 2006), значение γ (ND) также положительно коррелирует с величиной циклического потока (Munekage et al., 2002, 2004; Zivcak et al., 2013). Однако механизмы этих связей остаются неясными.

Самая простая схема FCI, основанная на Klughammer и Schreiber (1994), Vredenberg и Bulychев (2010) и включающая окисление P₇₀₀ и восстановление P₇₀₀⁺,

была использована для анализа механизмов фотосинтетического ответа (рис. 6.4.). Используя эту схему, EF (PSII) и EF (C) можно описать уравнениями (11) и (12):

$$EF(PSII) = k_L \times \gamma(ND), \quad (11)$$

$$EF(C) = k_C \times \gamma(ND). \quad (12)$$

где k_C и k_L – константы скорости, отражающие восстановление окисленного P_{700} (P_{700}^+) в ходе циклического и нециклического потоков электронов, соответственно.

Таблица 3

	ВП	Снижение $[CO_2]$ до 10–15 мкмоль/м ² с	Снижение $[CO_2]$ до 150 мкмоль/м ² с	ВП при $[CO_2]=$ 15 мкмоль/м ² с
Относительный EF(C) _{нач} , %	26,6 ± 3,2	25,5 ± 4,9	23,5 ± 3,3	57,2 ± 3,8
Относительный EF(C) _{макс} , %	37,9 ± 2,7*	59,9 ± 3,5*	35,8 ± 3,7*	69,5 ± 3,0*
Относительные изменения EF(C), %	11,3 ± 1,3*	34,5 ± 3,0	12,3 ± 1,0*	12,3 ± 1,6*

* – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Существуют два возможных механизма наблюдаемой связи между увеличением $\gamma(ND)$ и EF(C). Во-первых, увеличение k_C может быть основным путём возрастания циклического потока электронов, индуцированного ВП или снижением $[CO_2]$ в контрольных условиях. Такой вариант может быть реализован при активации любой стадии циклического потока электронов за исключением восстановления P_{700}^+ и увеличения концентрации восстановленного пластоцианина. В этом случае k_C вносит большой вклад в преобразование P_{700}^+ в P_{700} и тем самым снижает $\gamma(ND)$ (рис 6.4). Таким образом, должно наблюдаться снижение $\gamma(ND)$, увеличение циклического потока электронов, а также отрицательная корреляция между изменениями в EF(C) и $\gamma(ND)$. Эти результаты противоречат экспериментальным результатам (рис. 6.2., табл. 2), опровергая такую гипотезу. Во-вторых, уменьшение k_L подавляет преобразование P_{700}^+ в P_{700} и/или увеличение k_{hv} активирует преобразование P_{700} в P_{700}^+ , которое затем увеличивает $\gamma(ND)$ (рис 6.4). В соответствии с уравнением (11), увеличение $\gamma(ND)$ необходимо для активации циклического потока электронов. В результате происходит увеличение $\gamma(ND)$ и EF(C) и в этом случае должна наблюдаться положительная корреляция между изменениями в EF(C) и $\gamma(ND)$. Второй вариант находится в полном

соответствии с экспериментальными результатами. Таким образом, предполагается следующая цепочка событий: ВП $\rightarrow$... $\rightarrow$ увеличение $\gamma(\text{ND}) \rightarrow$ рост $\text{EF}(\text{C})$.

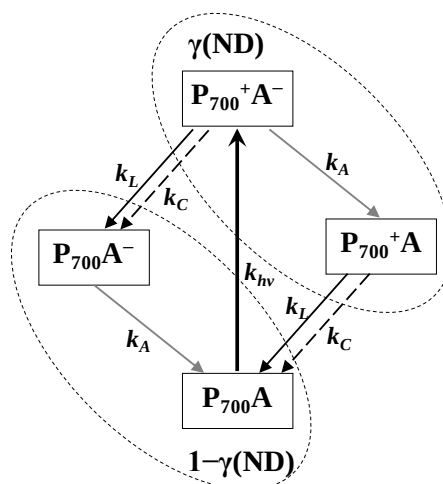


Рис 6.4. Схема состояний ФЦИ, основанная на Klughammer, Schreiber (1994) и Vredenberg, Bulychев (2010). P_{700}^+ и P_{700} , окисленная и восстановленная формы первичного донора электронов ФЦИ, соответственно; A и A^- , окисленная и восстановленная формы акцептора ФЦИ, соответственно; параметр $k_{hv} = \gamma \times \text{PFD} \times p \times (1 - dII)$, скорость окисления P_{700} , где γ – коэффициент пропорциональности; параметры $k_L = k_{PC} \times [PC^-]_L$ и $k_C = k_{PC} \times [PC^-]_C$ – константы скоростей потока электронов через ФЦИ нециклического и циклического потока электронов, соответственно; k_{PC} – константа скорости окисления пластоцианина P_{700}^+ ; $[PC^-]_L$ – концентрация восстановленного пластоцианина, участвующего в потоке через ФЦИ; $[PC^-]_C$ – концентрация восстановленного пластоцианина, участвующего в циклическом потоке; k_A – константа скорости окисления акцепторной стороны ФЦИ, связанная с циклическим, нециклическим и псевдоциклическим потоками; $\gamma(\text{ND})$ – доля $P_{700}^+A^-$ и P_{700}^+A (Klughammer, Schreiber, 2008); $1-\gamma(\text{ND})$ – доля $P_{700}A^-$ и $P_{700}A$.

Аналогичный анализ может быть использован для изучения связи между увеличением $\gamma(\text{ND})$ и снижением $\text{EF}(\text{PSII})$ (рис 6.1, 6.2, табл. 2). Положительное влияние изменений k_C маловероятно, потому что увеличение k_C снижает $\gamma(\text{ND})$ (см. выше), а уменьшение k_C – снижает $\text{EF}(\text{C})$ (уравн. 11); и то, и другое – противоречит экспериментальным результатам. Увеличение k_{hv} может увеличивать $\gamma(\text{ND})$ (рис. 6.4), однако если $\gamma(\text{ND})$ увеличивается, а k_L не изменяется, то $\text{EF}(\text{PSII})$ должен возрастать (уравн. 10), что также противоречит экспериментальным результатам. Кроме того, основной причиной изменений k_{hv} является модификация dII , но dII , вероятно, не зависит от ВП. В качестве альтернативы, снижение k_L подавляет преобразование P_{700}^+ в P_{700} и увеличение $\gamma(\text{ND})$ (рис. 6.4), а также уменьшает $\text{EF}(\text{PSII})$ (уравн. 10). Снижение k_L могло быть вызвано инактивацией любой стадии нециклического транспорта

электронов, который предшествует ФСІ и приводит к снижению концентрации восстановленного пластоцианина. Последний вариант хорошо соответствует полученным экспериментальным результатам (уменьшение $EF(PSII)$, рост $\gamma(ND)$ и отрицательная корреляция между изменениями в $EF(PSII)$ и $\gamma(ND)$). Снижение k_L приводит к уменьшению притока электронов от $PSII$. Таким образом, предложена следующая цепь событий: $ВП \rightarrow \dots \rightarrow$ уменьшение $EF(PSII) \rightarrow$ увеличение $\gamma(ND) \rightarrow$ рост $EF(C)$.

Представленные результаты показывают, что снижение $EF(PSII)$ отражает ВП-индуцированное уменьшение $\gamma(PSII)$ (рис. 6.1, табл. 2). Согласно опубликованным данным (Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2012, 2014) и настоящим результатам, уменьшение $EF(PSII)$ в основном индуцировано инактивацией темновой стадии фотосинтеза. В подтверждение этого вывода была найдена высокая корреляция изменений A и $EF(PSII)$, а снижение скорости ассимиляции CO_2 , при понижении $[CO_2]$ приводящее к уменьшению потока электронов через ФСІІ, было аналогично эффекту ВП. Кроме того, ВП-индуцированные изменения $EF(PSII)$ в условиях низкой $[CO_2]$ были меньше, чем изменения в контрольных условиях. Тем не менее, при генерации ВП снижение $EF(PSII)$ происходило и при низкой $[CO_2]$. Принимая во внимание, что уменьшение A в этих экспериментах ($-1,08 \pm 0,21$ мкмоль/ m^2c) ничем не отличалось от ВП-индуцированной реакции дыхания ($-1,10 \pm 0,20$ мкмоль/ m^2c , Sukhov et al., 2014), можно предположить, что ВП также может подавлять поток электронов через ФСІІ при инактивации темновой стадии фотосинтеза. Увеличение NPQ может быть потенциальным механизмом влияния ВП на ФСІІ, потому что реакция этого показателя слабо зависит от индуцированного электрическим сигналом снижения ассимиляции CO_2 (Sukhov et al., 2014). В результате была предложена следующая цепочка событий: $ВП \rightarrow \dots \rightarrow$ инактивация фотосинтетической темновой стадии и увеличение $NPQ \rightarrow$ уменьшение $EF(ФСІІ) \rightarrow$ увеличение $\gamma(ND) \rightarrow$ увеличение $EF(C)$.

Вызванный ВП поток протонов из апопласта в цитоплазму, строму и люмен является возможным механизмом для начальной индукции реакции фотосинтеза, в том числе снижения $\gamma(PSII)$ (Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2014). Известно, что генерация ВП связана с переходной инактивацией H^+ -АТФазы и входом протонов (Stahlberg et al., 2006), которая изменяет внутри- и внеклеточный pH (Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2014). Тем не менее, снижение внутриклеточного pH может подавлять

фотосинтетическую активность ФСII и индуцировать NPQ (Булычев и др., 2013; Grams et al., 2009; Bulychev et al., 2013; Sukhov et al., 2013, 2014). Принимая во внимание эти факты, можно предположить, что $ВП \rightarrow \text{вход } H^+ \rightarrow \text{инактивация темновой стадии фотосинтеза и рост NPQ} \rightarrow \text{уменьшение EF(PSII)} \rightarrow \text{увеличение } \gamma(\text{ND}) \rightarrow \text{рост EF(C)}$.

Следует отметить, что инактивация темновой стадии фотосинтеза может увеличить НАДФН:НАДФ⁺, что снижает нециклический поток электронов через акцепторную сторону ФСI и может стимулировать циклический поток электронов (Pavlovič et al., 2011). Тем не менее этот процесс (снижение k_A на рис. 6.4) индуцирует увеличение $P_{700}A^-$ ($\gamma(\text{NA})$), что не наблюдалось в экспериментах с различными концентрациями CO_2 (табл. 2). Поэтому изменение отношения НАДФН:НАДФ⁺ вряд ли будет основным механизмом роста EF(C), но может играть незначительную роль в этом процессе.

Таким образом, ВП увеличивает абсолютный и относительный циклический поток электронов. Физиологическая роль этого ответа может быть связана с повышением устойчивости фотосинтетического аппарата к действию стрессоров. Известно, что циклический поток электронов может поддерживать высокий протонный градиент на мембране тилакоидов, способствовать синтезу АТФ и увеличивать NPQ (Zhang, Sharkey, 2009; Joliot, Johnson, 2011). Кроме того, циклический поток электронов защищает ФСI и может регулировать продукцию активных форм кислорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Rumeau et al., 2007; Roach, Krieger-Liszkay, 2014).

Увеличение NPQ является важным механизмом воздействия циклического потока электронов на устойчивость фотосинтетического аппарата к стрессовым факторам (Munekage et al., 2002, 2004; Zhang, Sharkey, 2009; Joliot, Johnson, 2011). Рост NPQ наблюдался при умеренном освещении (около $200 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$) (Munekage et al., 2002, 2004). Miyake et al. (2004, 2005) показали, что NPQ сильно зависело от циклического потока электронов, когда $\text{EF(PSI)/EF(PSII)} > 1,2\text{--}1,3$. Из таблицы 3 видно, что ВП активировал относительный EF(C) с 27 до 38% у гороха (EF(PSI)/EF(PSII) увеличивалось с 1,37 до 1,61), т.е. активация циклического потока электронов может влиять на NPQ. Из рис. 6.3 видно, что NPQ и относительный EF(C) линейно связаны, что можно интерпретировать в соответствии с Miyake et al. (2004, 2005) как стимуляцию NPQ циклическим потоком электронов. Положительная корреляция между NPQ и

относительным EF(C) в контрольных условиях также поддерживает эту гипотезу. Таким образом, можно предположить, что ВП-индуцированная активация циклического потока электронов стимулирует NPQ, тем самым увеличивая устойчивость фотосинтетического аппарата.

Можно заключить, что механизмами роста устойчивости ФСІ может быть рост нефотохимического тушения флуоресценции и усиление циклического потока электронов.

6.2. Повреждение фотосистемы II как механизм защиты фотосистемы I

Как было показано в предыдущих разделах работы, ВП инактивируют темновые реакции фотосинтеза, что приводит к стимуляции NPQ и циклического потока электронов вокруг ФСІ, а также может вызывать повышение концентрации АТФ в строме хлоропластов (Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2014a). Снижение активности ФСII, которое инициируется этими процессами, может вносить вклад в устойчивость ФСІ к стрессорам (Sonoike, 2011; Tikkanen et al., 2014; Tikkanen, Aro, 2014). Так, согласно гипотезе Aro с сотрудниками (Tikkanen et al., 2014, Tikkanen, Aro, 2014), ограничение потока электронов от ФСII может защищать ФСІ от окислительного стресса, и таким образом увеличение повреждения ФСII может уменьшить повреждение ФСІ. С учетом эффективного восстановления ФСII после повреждения и очень слабого восстановления повреждений ФСІ, этот механизм способен защитить фотосинтетический аппарат в целом (Tikkanen et al., 2014).

Результаты, представленные в пунктах 5.1, 5.2 показывают, что ВП стимулирует повреждение ФСII при тепловом стрессе, поэтому можно предположить, что такое повреждение ФСII, приводит к защите ФСІ при нагревании. Для детальной проверки этого предположения была проведена отдельная серия экспериментов, в ходе которой контрольные растения и растения после индукции ВП подвергали быстрому и кратковременному нагреву в горячей воде (5 мин, 45 или 50°C). Ожидалось, что такой эксперимент позволит более точно выявить возможную связь повреждения фотосистем.

Первый этап анализа показал, что индукция ВП приводит к увеличению остаточной активности ФСІ и некоторому снижению такой активности для ФСII после нагрева до 50°C (рис. 6.5). Эффект наиболее выражен для вариантов с временным интервалом между индукцией ВП и нагревом листа равным 5 минутам. Важно также

отметить, что положительное влияние предварительной индукции ВП на активность ФСІ наблюдалось как через 15 минут после окончания нагрева, так и через 135 минут после этого. Таким образом, ВП способен оказывать определенное защитное действие на ФСІ и в условиях быстрого нагрева. В то же время уменьшение остаточной активности ФСІІ показывает, что уменьшение транспирации не единственный механизм усиления её повреждения высокой температурой после ВП, так как в условиях быстрого нагрева в воде транспирация не может оказать никакого влияния на температуру листа. Следует отметить, что положительное влияние ВП не было выявлено в случае более медленного нагрева листа (45°C), что также хорошо согласуется с результатами, полученными на предыдущих этапах работы.

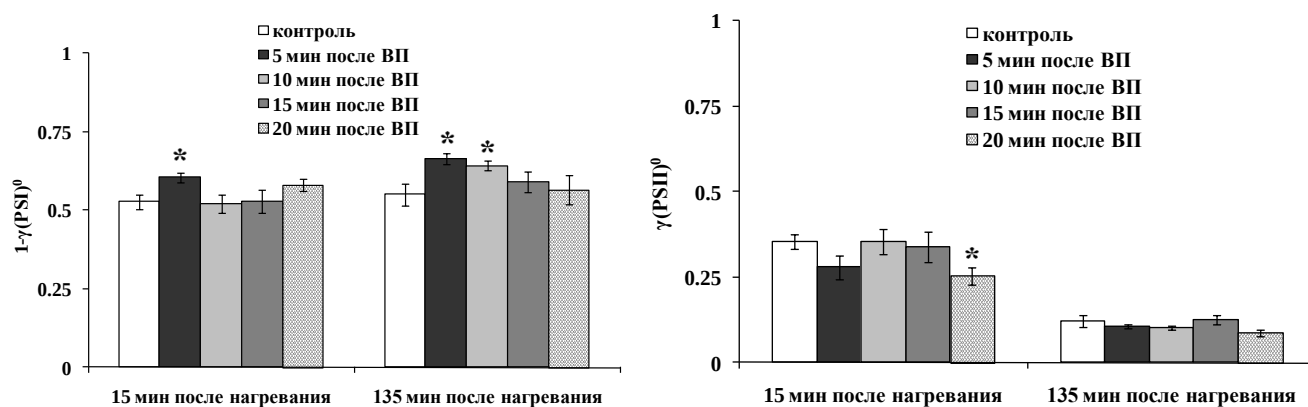


Рис. 6.5. Влияние локального ожога на активность ФСІ ($1-\gamma\text{PSI}^0$, (а)) и ФС ІІ (γPSII^0 , (б)), через 15 мин и 135 мин после нагревания до 50°C ($n=6-11$). γPSI^0 – квантовый выход ФСІ после 10 с освещения дальним красным светом, γPSII^0 – максимальный квантовый выход ФС ІІ. Ожог наносился на 1-ый зрелый лист, 2-ой лист инкубировали в горячей воде (5 мин, 50°C). Темновая адаптация перед регистрацией γPSI^0 и γPSII^0 составляла 10 мин. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Рис. 6.6 показывает диаграммы рассеяния, позволяющие оценить связь остаточной активности ФСІ и ФСІІ после быстрого нагрева листьев растения в воде. При этом можно отметить положительную корреляцию между активностью ФСІ и ФСІІ после нагревания при 45°C (рис. 6.6а,б). Этот результат показывает, что уровень повреждения ФСІІ не оказал положительного влияние на активность ФСІ после нагревания при 45°C . Наблюдаемая при этом положительная корреляция, вероятно, отражает тот факт, что индивидуальные характеристики устойчивости ФСІ и ФСІІ различных растений в эксперименте были очень похожи. Важно отметить, что положительное влияние ВП также отсутствовало после нагрева до 45°C в этой серии

экспериментов. Однако при более сильном нагреве (50°C) наблюдалась высокая отрицательная корреляция между активностью ФСІ и ФСІІ через 15 мин после окончания нагрева (рис. 6.6в). Эти данные хорошо согласуются с работой Aro и сотрудников (Tikkanen et al., 2014; Tikkanen, Aro, 2014) и с тем фактом, что ВП увеличивал активность ФСІ после нагревания в этих условиях. Таким образом, результаты подтверждают гипотезу о том, что вызванное ВП повреждение ФСІІ при нагревании может способствовать повышению устойчивости ФСІ к высокой температуре.

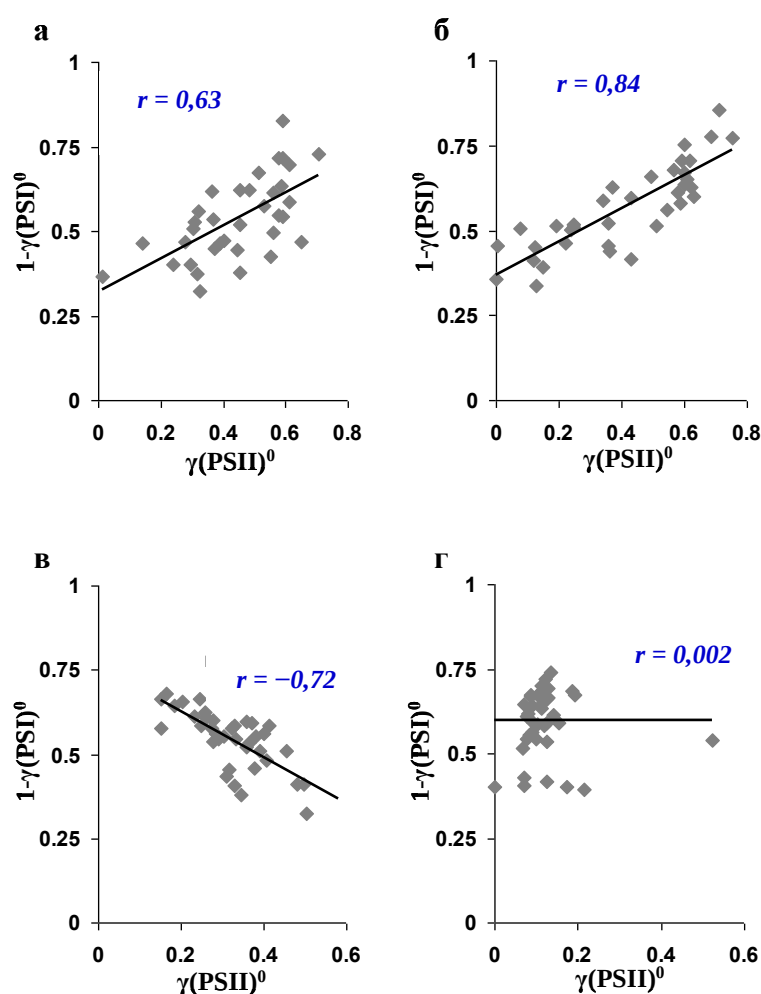


Рис. 6.6. Корреляция активности фотосистемы I ($1-\gamma(\text{PSI})^0$) и активности фотосистемы II ($\gamma(\text{PSII})^0$) через 15 мин после нагрева в водяной бане до 45°C (а), через 135 мин после нагрева до 45°C (б), после 15 мин прогрева листа до 50°C (в), через 135 мин после нагрева до 50°C (г) ($n=37-42$). Для анализа использовались как контрольные растения без ВП, так и экспериментальные с ВП, каждая точка соответствует одной повторности. r – коэффициент корреляции Пирсона. Различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Вполне вероятно, что существуют различные механизмы ВП-стимулируемого повреждения ФСІІ при нагревании. В пункте 5.3 было показано, что повреждение ФСІІ

было связано с ВП-индуцированным снижением транспирации и усилением нагрева листа, однако повреждение ФСII после ВП имеет тенденцию к увеличению при нагревании листа до постоянной температуры и при нагревании в горячей воде, где отсутствует регуляция транспирации. Известно (Murata et al., 2007), что сильная инактивация цикла Кальвина может быть одним из механизмов, вызывающих повреждение ФСII, когда растения находятся под действием стресса. Возможно, что ВП-индуцированная инактивация темновой стадии фотосинтеза (Sukhov et al., 2012; Gallé et al., 2013) стимулирует повреждение ФСII при нагревании.

Корреляция между активностями ФСI и ФСII через 135 мин после нагрева (рис. 6.6г) не наблюдалась, следовательно, вполне вероятно, что инактивация ФСII не вовлечена в длительные эффекты действия ВП на устойчивость ФСI. Известно, что повреждение ФСI практически необратимо (Tikkanen et al., 2014), поэтому восстановление ФСI является также маловероятным механизмом ВП-индуцированного увеличения активности ФСI по сравнению с контролем в этом временном промежутке. Соотношение R_m через 15 мин после нагрева к R_m через 135 мин после нагревания, где R_m отражает количество активных ФСI, составило 0,5-0,7 и существенно не зависело от ВП (данные не показаны). Этот результат свидетельствует о том, что повреждение ФСI продолжалось и после окончания нагрева, а восстановление ФСI отсутствовало.

Принимая во внимание отсутствие восстановления ФСI, такое повышение активности ФСI может быть отражением увеличения светового потока через эту фотосистему, которое может быть вызвано перераспределением световой энергии от ФСII к ФСI (Tikkanen et al., 2014, Tikkanen, Aro, 2014). Этот процесс не наблюдался после распространения ВП в контрольных условиях, однако его развитие возможно после нагревания.

Итак, результаты показывают, что, по крайней мере, два пути могут являться ответственными за эффекты ВП на повреждение ФСI после нагревания. Положительное влияние ВП на активность ФСI при нагревании и вскоре после него, вероятно, связано с ВП-индуцированной стимуляцией повреждения ФСII после нагревания. Может происходить следующая цепочка событий: локальный ожог → распространение ВП → инактивация фотосинтеза, включая подавление темновой стадии → увеличение повреждения ФСII при нагревании → уменьшение повреждения ФСI при нагревании. Положительное влияние ВП на активность ФСI, наблюдаемое через 135 мин после

нагрева, вероятно, имеет другой механизм, который связан с увеличением светового потока через ФСІ.

6.3. Увеличение содержания АТФ как потенциальный механизм восстановления фотосистемы II

Репарация ФСII является важным процессом, который поддерживает фотосинтетическую активность после действия различных стрессоров (Nath et al., 2013). В случае реализации влияния электрических сигналов этот процесс может иметь особое значение, так как на предыдущих этапах исследования было показано, что повреждение ФСII является одним из вероятных механизмов увеличения устойчивости ФСІ, вследствие чего репарация фотосистемы II особенно важна. Действительно, Ретивин и др. (1999а) показали, что электрические сигналы могут стимулировать репарацию ФСII. В случае ФСІ вопрос о репарации менее актуален, так как известно, что она слабо восстанавливается после повреждения (Sonoike, 2011; Tikkanen et al., 2014); однако синтез ФСІ *de novo* также участвует в восстановлении фотосинтетической активности после действия стрессоров. Оба отмеченных процесса требуют энергии, вследствие чего можно предполагать, что повышение концентрации АТФ является для них значимым. Связь между фотосинтетическими ответами и изменениями концентрации АТФ не была достаточно изучена, однако и ПД, и ВП могут повышать содержание АТФ во флоэмном экссудате (Ретивин и др., 1999б), а изменения концентрации АТФ показывают многофазную динамику (Пятыгин и др., 2008).

С другой стороны, на предыдущих этапах исследования было показано, что инактивация фотосинтеза, индуцированная электрическими сигналами у высших растений в основном связана со снижением активности темновой стадии фотосинтеза, что подтверждается также данными литературы (Шерстнева и др., 2015 а; Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2012, 2014). При этом предполагается, что инактивация темновой стадии фотосинтеза (Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2012, 2014) уменьшает расход АТФ и восстановление никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФН) в цикле Кальвина и таким образом должна увеличить содержание АТФ и НАДФН в строме хлоропласта. Избыток АТФ и НАДФН может быть использован различными системами переносчиков для передачи восстановителя из хлоропласта, что способствует

увеличению концентрации АТФ в цитоплазме (Hoefnagel et al., 1998; Noctor, Foyer, 2000).

Таким образом, повышение содержания АТФ в листе является вероятным результатом развития вызванного ВП фотосинтетического ответа. При этом в единственной экспериментальной работе (Fromm et al., 2013), посвященной влиянию электрических сигналов на содержание АТФ в листе, не было выявлено достоверных изменений ее содержания. Вследствие изложенного на следующем этапе исследования был проведен анализ влияния ВП на содержание АТФ в листьях.

Измерение содержания АТФ в покое показало, что ее концентрация составляет около 77 нмоль/г сырого веса во втором листе и 64 нмоль/г сырого веса в четвертом листе (рис. 6.7а). Такой результат хорошо согласуется с данными литературы о содержании АТФ в листьях высших растений (Lüttge, Ball, 1976; Gaff, Ziegler, 1989; Teixeira et al., 2005; Fromm et al., 2013; Li et al., 2013), которое обычно варьируется в пределах 40-180 нмоль/г сырого веса. На следующем этапе было проведено изучение вызванных локальным ожогом изменений содержания исследуемых макроэргических соединений. При этом локальный ожог наносили на первый зрелый лист проростков, а динамику изменения содержания АТФ исследовали во втором и четвертом листьях в условиях освещения. Локальный ожог первого зрелого листа вызвал увеличение содержания АТФ во втором листе, однако в четвертом листе повышения АТФ не наблюдалось (рис. 6.7б). Такой результат, по-видимому, связан с тем, что ВП распространяется в четвертый лист с очень существенным затуханием (его амплитуда в данном листе составляет около 8 мВ. При этом было показано, что во втором листе наблюдается сложная динамика концентрации АТФ. Так, через 5 минут после нанесения ожога наблюдалось недостоверное возрастание содержания АТФ по сравнению с контролем. Через 10 минут после ожога такое возрастание достигало первого максимума, который превышал контрольный уровень на 40 нмоль/г сырого веса. На 20-й минуте после ожога содержание АТФ значительно спадало, но всё равно недостоверно превышало контрольный уровень. В дальнейшем развивался второй максимум содержания АТФ через 30-50 мин после нанесения ожога, при этом превышение контрольного уровня составило 18-23 нмоль/г сырого веса. Двухфазная динамика изменений АТФ хорошо соотносится с динамикой изменений фотосинтетических параметров (см. пункт 3.1).

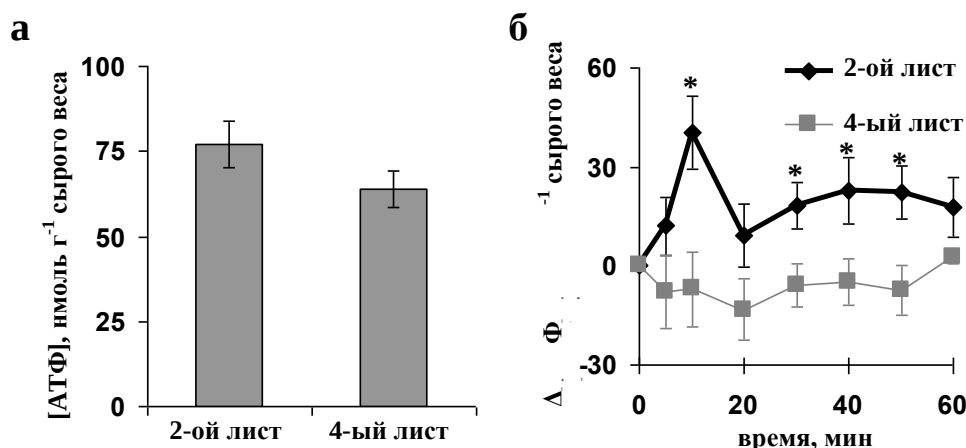


Рис. 6.7. Содержание АТФ во втором и четвёртом листьях гороха на свету (а), $n=14-26$; динамика содержания АТФ при локальном ожоге первого листа во втором и четвёртом листьях (б), $n=5-9$. $\Delta[\text{АТФ}]$ было рассчитано для каждой повторности и усреднены для каждой экспериментальной точки. Нулевая точка на оси времени указывает момент нанесения локального ожога первого листа. * – различия $\Delta[\text{АТФ}]$ с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Учитывая тот факт, что вызванное ВП увеличение содержания АТФ может быть обусловлено не только инактивацией фотосинтеза, но и активацией дыхания (Filek, Kościelniak, 1997), была проведена отдельная серия экспериментов, в которой влияние переменного потенциала на газообмен и АТФ было изучено в условиях затемнения листа. Исследование газообмена показало, что ВП временно увеличивал интенсивность дыхания второго листа проростка гороха (рис. 6.8а). Максимальная активация дыхания наблюдалась через 5 мин после ожога, это время схоже с первой инактивацией фотосинтеза. Тем не менее, величина изменений обмена CO_2 при предварительном затемнении была примерно $0,74 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$, что составило лишь 37% от ВП-индуцированных изменений A на свету ($1,98 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$). Амплитуды ВП во втором листе показали высокую корреляцию с величинами первой компоненты индуцированных ожогом изменений R_d ($0,82$, $p < 0,05$). Локальный ожог первого зрелого листа не влияет на интенсивность дыхания четвертого листа у проростков гороха (рис. 6.8б).

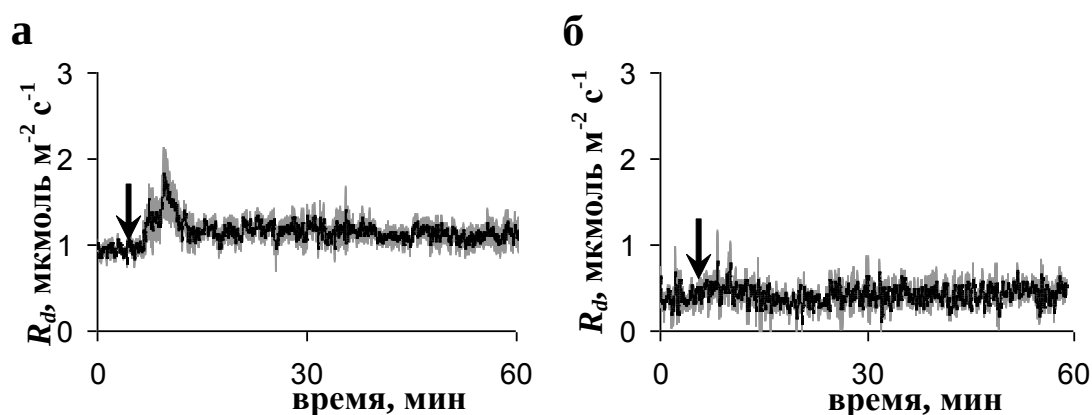


Рис. 6.8. Индуцированный ожогом ответ дыхания во втором (а) и четвертом (б) листе гороха ($n=5-6$). Средняя динамика ответа (черные сплошные линии) и стандартные ошибки (серая тень). Интенсивность дыхания в темноте (R_d) была рассчитана как $(-A)$. Стрелка указывает локальный ожог первого зрелого листа.

Для дальнейшего выявления возможной роли фотосинтеза в индуцированном локальным ожогом возрастании содержания АТФ во втором листе, такой ответ был также исследован в условиях затемнения. При этом анализ стационарного содержания АТФ во втором и четвертом листьях в условиях темноты показал, что концентрация АТФ существенно не изменяется в этих условиях и равна 65 и 57 нмоль/г сырого веса (рис. 6.9а), т.е. около 85-90% от уровня содержания АТФ в условиях освещенности. Это слабое снижение стационарного уровня содержания АТФ согласуется с литературными данными. Так известно, что стационарная концентрация АТФ в условиях низкой освещенности составляла около 60-90% от этого показателя на свету (Lüttge, Ball, 1976; Roeske, Chollet, 1989) что связано с процессом дыхания (Lüttge, Ball, 1976).

ВП индуцирует увеличение содержания АТФ во втором листе, достигающее максимума через 5 мин после ожога (рис. 6.9б). Величина возрастания $[АТФ]$ была 14 нмоль/г сырого веса, и составляла около 35% от индуцированного ВП изменения $[АТФ]$ ($\Delta[АТФ]$) на свету. Таким образом, ВП-индуцированное изменение дыхания умеренно повышало содержание АТФ в листьях. Достоверных изменений $[АТФ]$ в четвертом листе не наблюдалось.

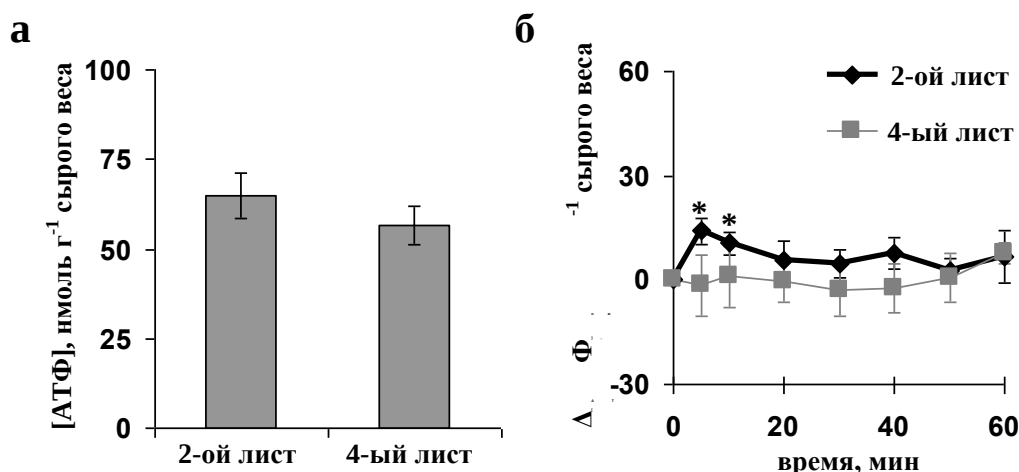


Рис. 6.9. Содержание АТФ во втором и четвёртом листьях гороха при предварительном затемнении (а), $n = 10-18$; динамика содержания АТФ при локальном ожоге первого листа во втором и четвёртом листе (б), $n = 5-8$. $\Delta[\text{АТФ}]$ были рассчитаны для каждой повторности и усреднены для каждой экспериментальной точки. Нулевая точка на оси времени указывает момент нанесения локального ожога первого листа. * – различия $\Delta[\text{АТФ}]$ с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Результаты показывают, что локальное раздражение может вызвать изменения содержания АТФ в неповрежденных листьях. Изменения имеют два максимума, которые соответствуют многофазной динамике содержания АТФ во флоэмном экссудате, наблюдаемой после индукции электрического сигнала (Пятыгин и др., 2008). Вероятно, индуцированная локальным стимулом фотосинтетическая инактивация (Sukhov et al., 2014) является основным механизмом увеличения концентрации АТФ. Есть несколько аргументов, подтверждающих эту гипотезу: (I) ответы фотосинтеза и изменения содержания АТФ во втором листе имеют очень схожую динамику, однако первая инактивация фотосинтеза формируется быстрее, чем первое увеличение концентрации АТФ в листьях; (II) фотосинтетические ответы и изменение содержания АТФ в четвертом листе отсутствуют и (III) рост содержания АТФ гораздо ниже в условиях темноты.

Следует отметить, что наблюдаемое нами изменение содержания АТФ, вызванное локальным ожогом, не согласуется с данными Fromm с соавторами (2013). Fromm с соавторами (2013) показали, что содержание АТФ в листьях кукурузы через 15 мин после механического повреждения существенно не отличалось от таковой в листьях контрольных растений. Тем не менее, в данной работе такое повреждение индуцировало только медленную инактивацию фотосинтеза, которая развивалась через 24-30 мин

после стимуляции. Таким образом, можно предположить, что увеличение содержания АТФ у растений кукурузы могло происходить через 24-30 мин после повреждения, в связи с чем не наблюдалась в этой работе.

Индукцированный локальным ожогом рост содержания АТФ во втором листе в условиях затемнения показывает, что активация дыхания также может вносить вклад в увеличение концентрации АТФ. Активация дыхания после электрических сигналов была выявлена у некоторых растений (Шерстнева и др., 2015 а; Hlaváčková et al., 2006; Filek, Kościelniak, 1997; Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2012), в том числе на горохе (Sukhov et al., 2014). Представленные результаты также показывают, что локальное раздражение индуцирует активацию дыхания во втором листе, и величина изменений R_d коррелирует с амплитудой ВП. Аналогичные динамики активации дыхания и возрастания АТФ во втором листе обеспечивают дополнительную поддержку участия дыхания в увеличении содержания АТФ в условиях темноты. И фотосинтетические изменения, и изменения содержания АТФ в четвертом листе отсутствуют, что также демонстрирует участие реакции дыхания в увеличении содержания АТФ.

Таким образом, ВП-индуцированная инактивация фотосинтеза и активация дыхания приводят к увеличению концентрации АТФ в листьях гороха. Такое увеличение содержания, с одной стороны, подтверждает предполагаемый механизм влияния ВП на фотосинтез, в соответствии с которым инактивация темновой стадии фотосинтеза должна приводить к увеличению содержания АТФ в строме и, вероятно, цитоплазме. С другой стороны, увеличение содержания АТФ является еще одним потенциальным механизмом повышения устойчивости фотосинтетического аппарата (Allakhverdiev et al., 2005) и растения в целом к действию неблагоприятных факторов, включая увеличение устойчивости к повышенной температуре, показанное в рамках настоящей работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе выполнения исследования результаты были обобщены в виде схемы, представленной на рис 7.1. Они показывают, что ВП влияет на фотосинтез преимущественно посредством инактивации темновой стадии фотосинтеза, что приводит к уменьшению интенсивности протекания процессов световой стадии, однако существуют и не связанные с темновой стадией пути влияния переменного потенциала на световую стадию фотосинтеза. Другим результатом распространения ВП является изменение устойчивости фотосинтетического аппарата к действию высокой температуры, которое проявляется в увеличении устойчивости ФСІ и усилении повреждения ФСІІ.

Увеличение устойчивости фотосистемы І, по-видимому, индуцируется вызванной ВП инактивацией фотосинтеза, в первую очередь – снижением активности темновой стадии фотосинтеза. В пользу этого свидетельствует высокая корреляция между снижением ассимиляции углекислого газа в ходе фотосинтетического ответа и теплоустойчивостью ФСІ, исчезновение влияния ВП на её устойчивость в условиях подавления изменений интенсивности протекания темновой стадии фотосинтеза, а также увеличение устойчивости фотосистемы І к высокой температуре при искусственной имитации подавления протекания темновой стадии фотосинтеза в условиях низкой концентрацией CO_2 . Основными механизмами повышения устойчивости ФСІ являются, по-видимому, активация циклического потока электронов и увеличение нефотохимического тушения флуоресценции, которые происходят в ходе развития фотосинтетического ответа. По-видимому, важную роль в повышении устойчивости фотосинтетического аппарата, усилении процессов репарации ФСІІ и синтеза ФСІ, а также в увеличении устойчивости растения в целом может играть увеличение содержания АТФ в листе, которое также наблюдается после ВП и связано, в первую очередь, с развитием фотосинтетического ответа.

Основным механизмом увеличения повреждения ФСІІ высокой температурой, которое наблюдается при предварительной индукции ВП, является снижение транспирации листа. Такое снижение, отражающее, вероятно, вызванное ВП закрытие устьиц, приводит к более сильному нагреву листа при той же внешней температуре, что является причиной усиления повреждения фотосистемы ІІ. Важно отметить, что

усиление повреждения, возможно, также играет защитную роль, снижая вероятность повреждения ФСІ активными формами кислорода, возникающими за счет потока электронов с ФСІІ.

Итоговым результатом вызванных ВП изменений устойчивости фотосинтетического аппарата является, по-видимому, увеличение общей устойчивости растения к повышенной температуре, которое было показано в данном исследовании. Таким образом, можно полагать, что распространение ВП является важным механизмом адаптации растения к изменениям условий среды.

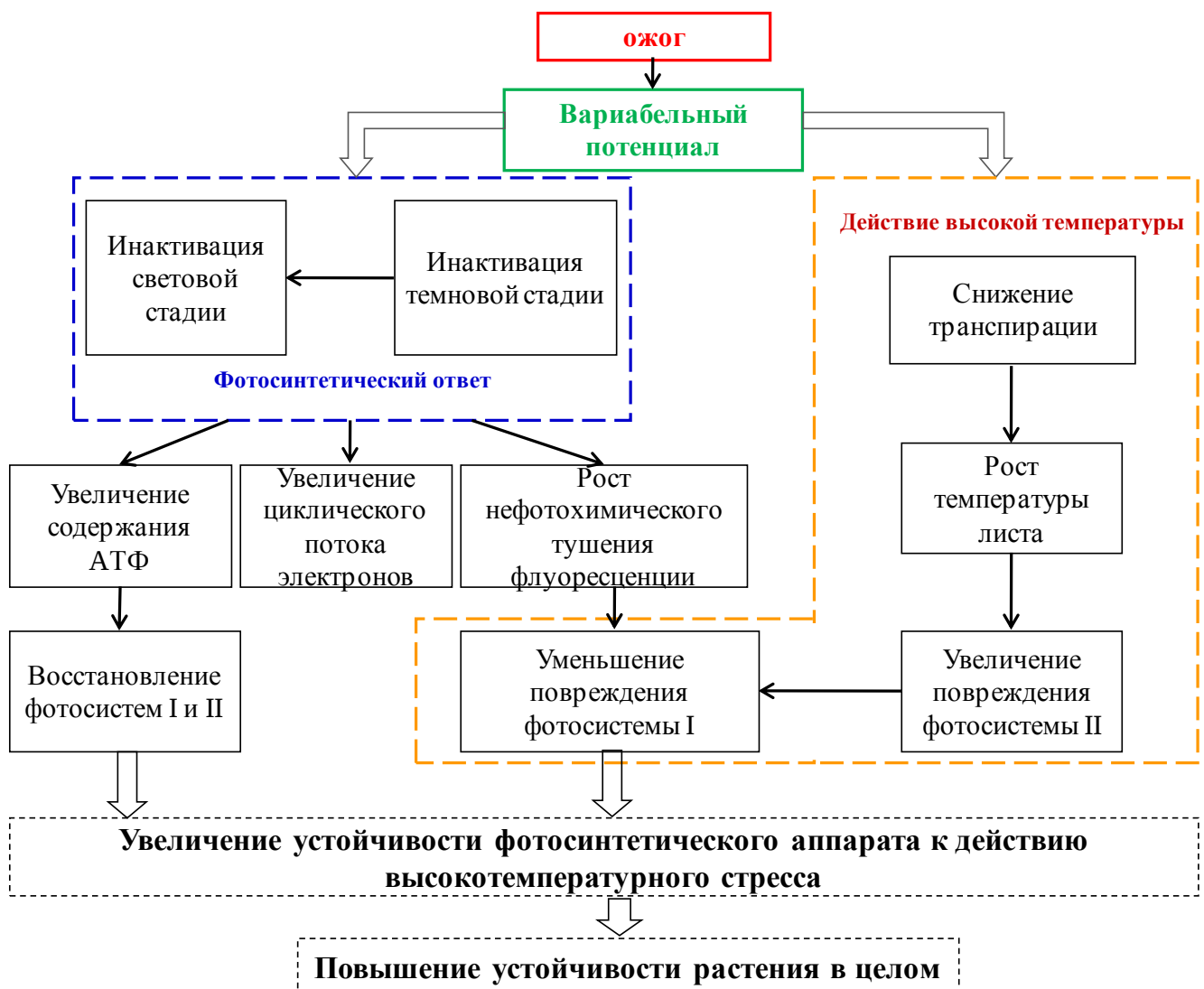


Рис. 7.1. Потенциальная схема участия переменного потенциала в изменении устойчивости фотосинтетических процессов у высших растений.

ВЫВОДЫ

1. В развитии инактивации фотосинтеза ключевую роль играет снижение активности его темновой стадии. Вызванное переменным потенциалом снижение транспирации, по-видимому, обусловлено уменьшением активности H^+ -АТФазы.

2. Переменный потенциал способен влиять на устойчивость фотосинтетического аппарата к действию высокотемпературного стресса, в частности увеличивая устойчивость фотосистемы I. Такое влияние на устойчивость, в первую очередь, связано с индуцированным переменным потенциалом снижением активности темновой стадии фотосинтеза.

3. Пути повышения устойчивости фотосистемы I могут являться рост нефотохимического тушения флуоресценции, увеличение циклического потока электронов, инкативация фотосистемы II.

4. Распространение переменного потенциала вызывает обратимое двухфазное повышение содержания АТФ в неповреждённых листьях проростков гороха. Такое повышение содержания АТФ связано с индуцированными переменным потенциалом изменениями активности фотосинтеза.

5. Переменный потенциал приводит к повышению общей устойчивости растения при действии высокотемпературного стресса. В повышение общей устойчивости растений, вероятно, вносят вклад изменение устойчивости фотосинтетического аппарата и повышение содержания АТФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллахвердиев С.И., Жармухамедов С.К., Климов В.В. Связь ингибирующего действия фенольного гербицида, диносеба, на перенос электронов в фотосистеме 2 с его окислительно-восстановительными свойствами // Известия национальной Академии наук Азербайджана. 2002. Т. 92. С. 209- 221.
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. Анализ роли ионов Ca^{2+} , H^+ и Cl^- в генерации вариабельного потенциала у растений тыквы // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 826-833
6. Воденеев В.А., Оприлов В.А., Пятыйгин С.С. Обратимое изменение внеклеточного рН при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo* // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 538-545.
7. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. К.: Альтерпрес, 2002. 188 с.
8. Креславский В.Д. Регуляция стресс-устойчивости фотосинтетического аппарата индукторами различной природы: Автореф. дисс. док. биол. наук. Москва, 2010. 40 с.
9. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т.59. С.163-178
10. Креславский В.Д., Любимов В.Ю., Котова Л.М., Котов А.А. Влияние предобработки хлорхолинхлоридом на устойчивость ФС II растений фасоли к УФ-В радиации, содержание фитогормонов и перекиси водорода // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 262–267.
11. Медведев С.С. Физиология растений: учебник. СПб.: БХВ-Петербург, 2012. 512 с.

12. Оприлов В.А. Функциональные аспекты биоэлектrogenеза у высших растений: 59-е Тимирязевское чтение. Н. Новгород: Издательство ННГУ, 1998. 46 с.
13. Оприлов В.А., Лобов С.А., Пятыхин С.С., Мысягин С.А. Анализ возможности участия локальных биоэлектрических реакций в рецепции охлаждения высшими растениями (на примере *Cucurbita pepo* L.) // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 905–912.
14. Оприлов В.А., Пятыхин С.С., Ретивин В.Г. Биоэлектrogenез у высших растений. М: Наука, 1991. 213 с.
15. 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.
16. Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Абрамова Н.Н., Лобов С.А., Федуллина 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. Ретивин В.Г., Оприлов В.А., Федуллина С.Б. Преадаптация тканей стебля *Cucurbita pepo* к повреждающему действию низких температур индуцированная потенциалом действия // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 499-510.
19. Сухов В.С., Калинин В.А., Сурова Л.М., Шерстнева О.Н., Воденев В.А. Математическое моделирование H^+ -сахарозного симпортера плазматической мембраны клеток высших растений // Биологические мембраны. 2013б. Т. 30, № 2. С. 128–135.
20. Сухов В.С., Пятыхин С.С., Оприлов В.А., Крауз В.О. Влияние распространяющихся электрических сигналов на замедленную флуоресценцию листьев герани. I. Экспериментальный анализ // Биофизика. 2008а. Т. 53, №3. С. 470–474.
21. Сухов В.С., Пятыхин С.С., Оприлов В.А., Крауз В.О. Влияние распространяющихся электрических сигналов на замедленную флуоресценцию листьев герани. II. Теоретический анализ // Биофизика. 2008б. Т. 53, №4. С. 672–678.
22. Сухов В.С., Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Румянцев Е.А., Воденев В.А. Влияние переменного потенциала на фотосинтез проростков тыквы (*Cucurbita pepo* L.) // Биофизика. 2013а. Т. 58, № 3. С. 468–473.

23. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. Уфа.: Гилем. 2001. 160 с.
24. Шерстнева О.Н., Воденеев В.А., Катичева Л.А., Сурова Л.М., Сухов В.С. Участие изменений внутри- и внеклеточного pH в развитии вызванного варибельным потенциалом фотосинтетического ответа у проростков тыквы // Биохимия. 2015а. Т. 8, № 6. С. 920–930.
25. Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Воденеев В.А., Плотникова Ю.И., Бушуева А.В., Сухов В.С. Изменения внутри- и внеклеточного pH участвуют в формировании разных компонент фотосинтетического ответа, вызванного варибельным потенциалом у проростков гороха // Биологические мембраны. 2015б. №5-6. С. 446–454.
26. Шерстнева О.Н., Воденеев В.А., Сурова Л.М., Новикова Е.М., Сухов В.С. Использование математической модели варибельного потенциала для анализа его влияния на фотосинтез высших растений // Биологические мембраны. 2016. Т. 33, № 4. С. 293-302.
27. Agami R.A., Mohamed G.F. Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2013. V. 94. P. 164–171.
28. Alarcon J.J., Malone M. Substantial hydraulic signals are triggered by leaf-biting insects in tomato // Journal of Experimental Botany. 1994. V. 45, № 7. P. 953–957.
29. 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.
30. 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.
31. Allen J.F. Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain // Trends. Plant Sci. 2003. V. 8. P. 15–19.
32. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 373–399.
33. Applewhite P.B. Behavioral plasticity in the sensitive plant, *Mimosa* // Behavioral Biology. 1972. V. 7. P. 47–53.

34. Arimura G.-I., Ozawa R., Maffei M.E. Recent advances in plant early signaling in response to herbivory // *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. V. 12. P. 3723–3739.
35. Arnadyttir J., Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels // *Annual Review of Biophysics*. 2010. V. 39. P. 111–137.
36. Bari R., Jones J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses // *Plant Molecular Biology*. 2009. V. 69. P. 473–88.
37. Bauer H., Ache P., Lautner S., Fromm J., Hartung W., Al-Rasheid K.A., Sonnewald S., Sonnewald U., Kneitz S., Lachmann N., Mendel R.R., Bittner F., Hetherington A.M., Hedrich R. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis // *Current Biology*. 2013. V. 23. P. 53–57.
38. Baydoun E.A., Fry S.C. The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone // *Planta*. 1985. V. 165. P. 269–276.
39. Beilby M.J. Action potential in charophytes // *Int. Rev. Cytol.* 2007. V. 257. P. 43–82.
40. Beilby M.J. Calcium and plant action potentials // *Plant Cell Environ.* 1984. V. 7. P. 415–421.
41. Beilby M.J. Cl⁻ channels in *Chara Phillos* // *Trans. R. Soc. London B*. 1982. V. 299. P. 435–445.
42. Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W., Roitsch T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato // *Physiol. Plant*. 2004. V. 122. P. 419–428.
43. 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.
44. Boari F., Malone M. Wound-induced hydraulic signals: survey of occurrence in a range of species. *Journal of Experimental Botany*. 1993. V. 44. P. 741–746.
45. Bouchabke O., Tardieu F., Simonneau T. Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand under moderate irrigation but not in water-saturated soil // *Plant, Cell and Environment* 2006. V. 29. P. 1138–1148.
46. Bramley H., Turner N.C., Turner D.W., Tyerman S.D. Comparison between gradient-dependent hydraulic conductivities of roots using the root pressure probe: the role of pressure propagations and implications for the relative roles of parallel radial pathways // *Plant, Cell and Environment*. 2007. V. 30. P. 861–874.

47. Breda N., Breda N., Huc R., Granier A., Dreyer E. Temperate forest tree and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences // *Annales des Sciences Forestieres*. 2006. V. 63. P. 625–644.
48. Bruce T.J.A. Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds // *Journal of Experimental Botany*. 2015. V. 66. P. 455–465.
49. Bukhov N.G., Wiese C., Neimanis S., Heber U. Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: Leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport // *Photosynth. Res.* 1999. V. 59. P. 81–93.
50. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A., Luengviriya J., Rubin A.B., Müller S.C. Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells // *J. Membr. Biol.* 2004. V. 202. P. 11–19.
51. Bulychev A.A., Komarova A.V., Rubin A.B. Propagation of photoinduced signals with the cytoplasmic flow along *Characean internodes*: evidence from changes in chloroplast fluorescence and surface pH // *Eur. Biophys. J.* 2013. V. 42. P. 441–453.
52. Choi W.G., Toyota M., Kim S.H., Hilleary R., Gilroy S. Salt stress-induced Ca^{2+} waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2014. V. 111. P. 6497–6502.
53. Christmann A., Grill E., Huang J. Hydraulic signals in long-distance signaling // *Current Opinion in Plant Biology*. 2013. V. 16. P. 293–300.
54. Christmann A., Weiler E.W., Steudle E., Grill E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage // *The Plant Journal*. 2007. V. 52. P. 167–174.
55. Cochard H., Breda N., Granier A. Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: evidence for stomatal control of embolism? // *Annals of Forest Science*. 1996. V. 53. P. 197–207.
56. Cortleven A., Nitschke S., Klaumünzer M., Abdelgawad H., Asard H., Grimm B., Riefler M., Schmölling T. A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the *Arabidopsis* histidine kinase2 and *Arabidopsis* histidine kinase3 receptors. *Plant Physiol.* 2014. V. 164. P. 1470–1483.
57. Cui J.X., Zhou Y.H., Ding J.G., Xia X.J., Shi K., Chen S.C., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber // *Plant Cell Environ.* 2011. V. 34. P. 347–358.

58. Davies E., Stankovic B. Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult / In: Baluska F, Mancuso S., Volkmann D. (eds) Communication in plants. Neuronal aspects of plant life. Springer, New York, 2006. pp. 309–320.
59. Davies W.J., Zhang J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil // Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. 1991. V.42. P. 55–76.
60. Degli Agosti R. Touch-induced action potentials in *Arabidopsis thaliana* // Arch. Des. Sci. 2014. V. 67. P. 125–138.
61. Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives // Critical Reviews in Plant Sciences. 2006. V. 25. P. 417–440.
62. Dziubińska 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.
63. Dziubińska H., Trêbacz K. Zawadzki T The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum* // Physiol. Plant. 1989. V. 75. P. 417–423
64. Ehlert B., Schöttler M.A., Tischendorf G., Ludwig-Müller J., Bock R. The paramutated SULFUREA locus of tomato is involved in auxin biosynthesis // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 3635–3647.
65. Endo A., Sawada Y., Takahashi H., Okamoto M., Ikegami K., Koiwai H., Seo M., Toyomasu T., Mitsuhashi W., Shinozaki K., Nakazono M., Kamiya Y., Koshiba T., Nambara E. Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells // Plant Physiology. 2008. V. 147. P. 1984–1993.
66. Ewers F.W., Fisher J.B. Variation in vessel length and diameter in stems of six tropical and subtropical lianas // American Journal of Botany. 1989. V. 76. P. 1452–1459.
67. Fariduddin Q., Khalil R., Mir B.A., Ahmad Y. 24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of *Cucumis sativus* under salt and/or copper stress // Environ. Monit. Assess. 2013. V. 185. P. 7845–7856.
68. 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.

69. Favre P., Degli Agosti R. Voltage-dependent action potentials in *Arabidopsis thaliana* // *Physiol Plant*. 2007. V. 131. P. 263–272.
70. Favre P., Greppin H., Degli Agosti R. Accession-dependent action potentials in *Arabidopsis* // *J. Plant Physiol*. 2011. V. 168. P. 653–660.
71. Felle H.H., Zimmermann M.R. Systemic signaling in barley through action potentials // *Planta*. 2007. V. 226. P. 203–214.
72. Filek M., Kościelniak 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.
73. Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Peña-Cortés 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.
74. Fisher D.B. Measurement of phloem transport rates by an indicator dilution // *Technique Plant Physiology*. 1990. V. 94. P. 455–462.
75. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // *Antioxid Redox Signal*. 2009. V. 11. P. 861–905.
76. Fromm J. Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa* // *Physiol Plant*. 1991. V. 83. P. 529–533.
77. 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.
78. Fromm J., Bauer T. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation // *J. Exp Bot*. 1994. V. 45. P. 463–469.
79. 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.
80. Fromm J., Fei H. Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil // *Plant Sci*. 1998. V. 132. P. 203–213.
81. 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.
82. Fromm J., Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants // *Plant Cell Environ*. 2007. V. 30. P. 249–257.

83. Frost C.J., Appel H.M., Carlson J.E., De Moraes C.M., Mescher M.C., Schultz J.C. Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores // *Ecology Letters*. 2007. V. 10. P. 490–498.
84. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks // *Current Opinion in Plant Biology*. 2006. V. 9. P. 436–442.
85. 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.
86. Gaff D.F., Ziegler H., ATP and ADP contents in leaves of drying and rehydrating desiccation tolerant plants // *Oecologia*. 1989. V. 78. P. 407–410.
87. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J. Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signaling // *Environmental and Experimental Botany* 2015. V. 114. P. 15–21.
88. Gallé 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 CO₂ // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 542–552.
89. Glauser G., Grata E., Dubugnon L., Rudaz S., Farmer E.E., Wolfender J.L. Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. V. 283. P. 16400–16407.
90. Gollan T., Passioura J.B., Munn R. Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves // *Australian Journal of Plant Physiology*. 1986. V. 13. P. 459–464.
91. Gonugunta V.K., Srivastava N., Raghavendra A.S. Cytosolic alkalization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. *Plant Signal. Behav.* 2009. V. 4. P. 561–564.
92. Gowing D.J.G., Davies W.J., Jones H.G. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus domestica* Borkh. // *Journal of Experimental Botany*. 1990. V. 41. P. 1535–1540.

93. 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.
94. Green T.R., Ryan C.A. // *Science*. 1972. V. 175, № 4. P. 776–777.
95. Grieco M.; Tikkanen M.; Paakkanen V.; Kangasjarvi S.; Aro E.M. Steady-state phosphorylation of light-harvesting complex II proteins preserves photosystem I under fluctuating white light // *Plant Physiol*. 2012. V. 160. P. 1896–1910.
96. Gururani M.A.; Mohanta T.K.; Bae H. Current understanding of the interplay between phytohormones and photosynthesis under environmental stress // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. P. 19055-19085.
97. Gururani M.A.; Upadhyaya C.P.; Strasser R.J.; Yu J.W.; Park S.W. Evaluation of abiotic stress tolerance in transgenic potato plants with reduced expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Sci*. 2013. V. 198. P. 7–16.
98. Gururani M.A.; Venkatesh J.; Ganesan M.; Strasser R.J.; Han Y.; Kim J.I.; Lee H.Y.; Song P.S. *In vivo* assessment of cold tolerance through chlorophyll-a fluorescence in transgenic zoysiagrass expressing mutant phytochrome // *A. PLoS ONE*. 2015. V. 10. Article e0127200.
99. Haberland G. *Das Reizleitende Gewebesystem der Sinnpflanze*. Leipzig: Engelmann-Verlag. 1890.
100. Harrison M.A. Cross-Talk Between Phytohormone Signaling Pathways Under Both Optimal and Stressful Environmental Conditions // In: *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants* / N.A. Khan et al. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012. pp. 49–76.
101. Herde O., Peña-Cortés 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.
102. Hewezi T., Leger M., Gentzbittel L. A comprehensive analysis of the combined effects of high light and high temperature stresses on gene expression in sunflower // *Annals of Botany*. 2008. V. 102. P. 127–140.
103. Hirayama T., Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future // *Plant J*. 2010. V. 61. P. 1041–1052.

104. Hlaváčková 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.
105. Hlavinka J., Nozkova- Hlaváčková 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.
106. Hoefnagel M.H.N., Atkin O.K., Wiskich J.T., Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1366. P. 235–255.
107. Howe G., Jander G. Plant immunity to insect herbivores // *Annual Review of Plant Biology* 2008. V. 59. P. 41–66.
108. 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.
109. Huang W., Zhang S.B., Cao K.F. Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection of tropical trees illuminated at temporal chilling temperature // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. P. 297–305.
110. 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.
111. Iqbal M., Ashraf M. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis // *Environ. Exp. Bot.* 2013. V. 86. P. 76–85.
112. Ivanov A.G., Krol M., Maxwell D., Huner N.P. Absciscic acid induced protection against photoinhibition of PSII correlates with enhanced activity of the xanthophyll cycle // *FEBS Lett.* 1995. V. 371. P. 61–64.
113. Jaspers P., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // *Physiol. Plant.* 2010. V. 138. P. 405–413.
114. Javid M.J., Sorooshzadeh A., Moradi F., Modarres Sanavy S.A.M., Allahdadi I. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants // *Australian Journal of Crop Science*. 2011. V. 5, № 6. P. 726–734.

115. 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. P. 23-27.
116. Johnson G.N. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1807. P. 384–389
117. Joliot P., Johnson G.N. Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011. V. 108. P. 13317–13322.
118. Joliot P., Joliot A. Cyclic electron flow in C3 plants // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1757. P. 362–368.
119. 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.
120. Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses // Planta. 2007. V. 225. P. 353–364.
121. Kaiser H., Grams T.E.E. Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica* // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 2087–2092.
122. 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.
123. 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.
124. Keren N., Berg A., van Kan P.J., Levanon H., Ohad I. Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 1579–1584.
125. Kessler A., Baldwin I. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature // Science. 2001. V. 291. P. 2141–2144.
126. Kessler A., Baldwin I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis // Annual Review of Plant Biology. V. 53. P. 299–328.

127. Kim K., Portis A.R.Jr. Oxygen-dependent H₂O₂ production by Rubisco // FEBS Lett. 2004. V. 571. P. 124–128.
128. Kim M.J., Go Y.S., Lee S.B., Kim Y.S., Shin J.S., Min M.K., Hwang I., Suh M.C. Seed-expressed casein kinase I acts as a positive regulator of the SeFAD2 promoter via phosphorylation of the SebHLH transcription factor // Plant Mol. Biol. 2010 V. 73. P. 425–437.
129. 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.
130. Klughammer C., Schreiber U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm // Planta. 1994. V. 192. P. 261–268.
131. Klughammer C., Schreiber U. Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I // PAM Application Notes. 2008. V. 1. P. 11–14.
132. Komatsu T., Kawaide H., Saito C., Yamagami A., Shimada S., Nakazawa M., Matsui M., Nakano A., Tsujimoto M., Natsume M., Abe H., Asami T., Nakano T. The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated post-transcriptional accumulation of chloroplast rRNA // Plant J. 2010. V. 61. P. 409–422.
133. Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K. D. Complexity of the heat stress response in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2007. V. 10. P. 310–316.
134. 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.
135. 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.
136. Krupenina N.A., Bulychev A.A., Roelfsema M.R.G., Schreiber U. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding // Photochem Photobiol Sci. 2008. V. 7. P. 681–688.
137. Król E., Dziubińska 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.

138. Król E., Dziubińska H., Trêbacz K. What do plants need action potentials for? In: DuBois ML (ed) Action potential: biophysical and cellular context, initiation, phases and propagation. Nova Science Publishers, New York, 2010, pp. 1–26.
139. Lang R.D., Volkov A.G. Solitary waves in soybean induced by localized thermal stress // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3. P. 224–228
140. Larkindale J., Knight M.R. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 682–695.
141. Larsson C.-M., Olsson T. Firefly assay of adenine nucleotides from algae: comparison of extraction methods // Plant Cell Physiol. 1979. V. 20. P. 145–155.
142. 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.
143. 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.
144. Lawson T. Guard cell photosynthesis and stomatal function // New Phytologist. 2009. V. 181. P. 13–34.
145. Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence // Curr Opin Plant Biol. 2009. V. 12, № 4. P. 451-8.
146. Leon J., Rojo E., Sanchez-Serrano J.J. Wound signalling in plants // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 1–9.
147. Li X., Zhang G., Sun B., Zhang S., Zhang Y., Liao Y., Zhou Y., Xia X., Shi K., Yu J., Stimulated leaf dark respiration in tomato in an elevated carbon dioxide atmosphere. Sci. Rep. 2013. V. 3. Article 3433.
148. Lipova L., Krchnak P., Komenda J., Ilik P. () Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes *in vivo* // Biochim. Biophys. Acta 2010. V. 1797. P. 63–70.
149. Lopez R., Badel E., Peraudeau S., Beaujard F. Tree shoot bending generates hydraulic pressure pulses: a new long-distance signal? // Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65. P. 1997–2008.

150. 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.
151. Lunevsky V.Z., Zherelova O.M., Vostrikov I.Y., Berestovsky G.N. Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels // Journal of Membrane Biology. 1983. V. 58. P. 43–58.
152. Lüttge U., Ball E. ATP levels and energy requirements of ion transport in cells of slices of greening barley leaves // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1976. V. 80. P. 50–59.
153. 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.
154. Maffei M.E., Mithefer A., Boland W. Before gene expression: early events in plant–insect interaction // Trends in Plant Science. 2007a. V. 12. P. 310–316.
155. Maffei M.E., Mithefer A., Boland W. Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release // Phytochemistry. 2007b. V. 68. P. 2946–2959.
156. Malone M. Hydraulic signals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 1993. V. 341. P. 33–39.
157. Malone M. Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings // Planta. 1992. V. 187. P. 505–510.
158. Malone M. Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L. // New Phytol. 1994. V. 128. P. 49–56.
159. Malone M., Alarcon J.-J., Palumbo L. An hydraulic interpretation of rapid, long-distance wound signalling in tomato // Planta. 1994. V. 193. P. 181–185.
160. Malone M., Stankovic B. Surface potentials and hydraulic signals in wheat leaves following localized wounding by heat // Plant Cell Environ. 1991. V. 14. P. 431–436.
161. Mancuso S. Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera* // Aust. J. Plant Physiol. 1999. V. 26. P. 55–61.
162. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 659–668.
163. Mayaba N., Beckett R.P., Csintalanj Z., Tuba Z. ABA Increases the Desiccation Tolerance of photosynthesis in the Afromontane Understorey Moss *Atrichum androgynum* // Annals of Botany. 2001. V. 88. P. 1093–1100.

164. Mikan C.J., Zak D.R., Kubiske M.E., Pregitzer K.S. Combined effects of atmospheric CO₂ and N availability on the belowground carbon and nitrogen dynamics of aspen mesocosms // *Oecologia*. 2000. V. 124. P. 432–445.
165. Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangl J.L., Mittler R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli // *Science Signaling*. 2009. V. 2. P. 1–10.
166. Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Lühje S., Vylegzhanina N., Buck F., Böttger M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32. P. 497–508.
167. Mithöfer A., Boland W. Plant defense against herbivores: chemical aspects // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. V. 63. P. 431–450.
168. Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination // *Trends in Plant Science*. 2006. V. 11. P. 15–19.
169. Mittler R., Blumwald E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation // *The Plant Cell*. 2015. V. 27. P. 64–70.
170. 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.
171. 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.
172. Miyake C., Shinzaki Y., Miyata M., Tomizawa K. Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1426–1433.
173. Mohr P.G., Cahill D.M. Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica* // *Functional Plant Biology*. 2003. V. 30. P. 461–469.
174. Mousavi S.A.R, Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signaling // *Nature*. 2013. V. 500. P. 422–426.

175. Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 1558-1566.
176. Munekage Y., Hashimoto M., Miyake C., Tomizawa K., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis // *Nature.* 2004. V. 429. P. 579–582.
177. Munekage Y., Hojo M., Meurer J., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis* // *Cell.* 2002. V. 110. P. 361–371.
178. Munemasa S., Mori I.C., Murata Y. Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells // *Plant Signal. Behav.* 2011. V. 6, № 7. P. 939-41.
179. Murata N.; Takahashi S.; Nishiyama Y.; Allakhverdiev S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 414–421.
180. Nakamura H., Muramatsu M., Hakata M., Ueno O., Nagamura Y., Hirochika H., Takano M., Ichikawa H. Ectopic overexpression of the transcription factor OsGLK1 induces chloroplast development in non-green rice cells // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. P. 1933–1949.
181. Nath K., Jajoo A., Poudyal R.S., Timilsina R., Park Y.S., Aro E.M., Nam H.G., Lee C.H. Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress conditions // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3372–3381.
182. Neill S., Desikan R., Hancock J. Hydrogen peroxide signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 388–395.
183. Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S.I., Inaba M., Yokota A., Murata N. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery // *EMBO J.* 2001. V. 20, № 20. P. 5587–5594.
184. Niu L., Liao W. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 230.
185. Noctor G., Foyer C.H. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. P. 347–356.
186. 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.

187. Oukarroum A., Goltsev V., Strasser R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820nm reflection // PLoS One. 2013.V. 8. Article e59433.
188. Oyarce P., Gurovich L. Evidence for the transmission of information through electric potentials in injured avocado trees // Journal of Plant Physiology. 2011. V. 168. P. 103–108.
189. Passioura J.B. The effect of root geometry on the yield of wheat growing on stored water // Australian Journal of Agricultural Research. 1972. V. 23. P. 745–752.
190. Pavlovič 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.
191. 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.
192. Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells // Nature. 2000. V. 406, № 17. P. 731–734.
193. Peña-Cortés 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.
194. Peña-Cortés H., Sanchez-Serrano J., Rocha-Sosa M., Willmitzer L. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding // Planta. 1988. V. 174, № 1. P. 84-89.
195. Petrov V.D., Van Breusegem F. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells // AoB Plants. 2012. Article pls014.
196. Pickard B.G. Action potentials in higher plants // Botanical Review. 1973. V. 39. P. 172–201.
197. Pikulenko M.M., Bulychev A.A. Light-triggered action potentials and changes in quantum efficiency of photosystem II in *Anthoceros* cells // Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. P. 584–590.
198. Reddy A.S.N., Ali G.S., Celesnik H., Day I.S. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression // The Plant Cell. 2011. V. 23. P. 2010–2032.

199. Rivero R.M., Gimeno J., van Deynze A., Walia H., Blumwald E. Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK:*IPT* prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 1929–1941.
200. Roach T., Krieger-Liszkay A. Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2014. V. 15. P. 351–362.
201. Rochaix J.D. Regulation and dynamics of the light-harvesting system // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. P. 287–309.
202. Roeske C.A., Chollet R. Role of metabolites in the reversible light activation of pyruvate, orthophosphate dikinase in *Zea mays* mesophyll cells *in vivo* // *Plant Physiol.* 1989. V. 90. P. 330–337.
203. 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.
204. Rumeau D., Peltier G., Cournac L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 1041–1051.
205. Salleo S., Lo Gullo M.A., Raimondo F., Nardini A. Vulnerability to cavitation of leaf minor veins: any impact on leaf gas exchange? // *Plant, Cell and Environment.* 2001. V. 24. P. 851–859.
206. Sanderson J.B. On the electromotive properties of the leaf of *Dionaea* in the excited and unexcited states // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 1888. V. 179. P. 417–449.
207. Sejima T., Takagi D., Fukayama H., Makino A., Miyake C. Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem I in sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. P. 1184–1193.
208. Sevriukova O., Kanapeckaite A., Lapeikaite I., Kisnieriene V., Ladygiene R., Sakalauskas V. Charophyte electrogenesis as a biomarker for assessing the risk from low-dose ionizing radiation to a single plant cell // *J. Environ. Radioact.* 2014. V. 136. P. 10–15.
209. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 187.
210. Sharkey T.D., Zhang R. High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. P. 712–722.

211. Sharma I., Ching E., Saini S., Bhardwaj R., Pati P.K. Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1 // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 69. P. 17–26.
212. Shepherd V.A., Beilby M.J., Al Khazaaly S.A., 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 Environ.* 2008. V. 31. P. 1575–1591.
213. Shimmen T. Electrical perception of ‘death message’ in *Chara*: involvement of turgor pressure // *Plant and Cell Physiology.* 2001. V. 42. P. 366–373.
214. Shvetsova T., Mwesigwa J., Labady A., Kelly S., Thomas D., Lewis K., Volkov A.G. Soybean electrophysiology: effects of acid rain // *Plant Science.* 2002. V. 162. P. 723–731.
215. Sibaoka T. Rapid plant movements triggered by action potentials // *Bot. Mag. Tokyo.* 1991. V. 104. P. 73–95.
216. Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Miszalski Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses // *Acta Biochim. Pol.* 2007. V. 54. P. 39–50.
217. Sonoike K. Photoinhibition of photosystem I // *Physiol Plant.* 2011. V. 142. P. 56–64.
218. Spetea C., Rintamäki E., Schoefs B. Changing the light environment: Chloroplast signaling and response mechanisms // *Philos. Trans. R. Soc. Lond B: Biol. Sci.* 2014. Article 369.
219. Sreenivasulu N., Harshavardhan V.T., Govind G., Seiler C., Kohli A. Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? // *Gene.* 2012. V. 506. P. 265–273.
220. 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.
221. 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.
222. 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.

223. Stahlberg R., Cosgrove D.J. Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. I. Short-distance effects are a result of wounding // *Plant, Cell and Environment*. 1994. V. 17. P. 1143–1151.
224. Stahlberg R., Cosgrove D.J. Slow wave potentials in cucumber differ in form and growth effect from those in pea seedlings // *Physiologia Plantarum*. 1997a. V. 101. P. 379–388.
225. Stahlberg R., Cosgrove D.J. The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls // *Plant Physiol*. 1997. V. 113. P. 209–217.
226. Stahlberg R., Van Volkenburgh E., Cleland R.E. Long-distance signaling within *Coleus x hybridus* leaves; mediated by changes in intra-leaf CO₂? // *Planta*. 2001. V. 213, № 3. P. 342–351.
227. 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.
228. 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.
229. Steinmann K., Siegwolf R.T.W., Saurer M., Kerner C. Carbon fluxes to the soil in a mature temperate forest assessed by ¹³C isotope tracing // *Oecologia*. 2004. V. 141. P. 489–501.
230. Stratmann J.W. Long distance run in the wound response – jasmonic acid is pulling ahead // *Trends in Plant Science*. 2003. V. 8. P. 247–250.
231. Sukhov V. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants // *Photosynth Res*. 2016. V. 130. P. 373–387.
232. 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.
233. Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. Simulation of action potential propagation in plants // *J. Theor. Biol*. 2011. V. 291. P. 47–55.
234. 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.
235. Sukhov V., Sherstneva O., Surova L., Katicheva L., Vodeneev V. Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea // *Plant Cell Environ*. 2014. V. 37. P. 2532–2541

236. 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 // *Funct. Plant Biol.* 2015a. V. 42. P. 727–736.
237. Sukhov V., Vodeneev V. A mathematical model of action potential in cells of vascular plants // *J. Membr. Biol.* 2009. V. 232. P. 59–67.
238. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. P. 2269–2276.
239. Taiz L. Regulation of cell wall mechanical properties // *Annual Review of Plant Physiology.* 1984. V. 35. P. 585–657.
240. Takagi D., Takumi S., Hashiguchi M., Sejima T., Miyake C. Superoxide and singlet oxygen produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition // *Plant Physiol.* 2016. V. 171, № 3. P. 1626–1634.
241. Takahashi S., Badger M.R. Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 53–60.
242. Takahashi S., Murata N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? // *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. P. 178–182.
243. Tang A.C., Boyer J.S. Growth-induced water potentials and the growth of maize leaves // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53, № 368. P. 489–503.
244. Tang A.C., Boyer J.S. Root pressurization affects growth-induced water potentials and growth in dehydrated maize leaves // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54, № 392. P. 2479–2488.
245. Teixeira R.T., Knorpp C., Glimelius K. Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus* // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 1245–1253.
246. Tikhonov A.N. pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts // *Photosynth. Res.* 2013. V. 116. P. 511–534.
247. Tikhonov A.N. The cytochrome b6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways // *Plant Physiol.* 2014. *Biochem.* V. 81. P. 163–183.
248. Tikkanen M., Aro E.M. Integrative regulatory network of plant thylakoid energy transduction // *Trends Plant Sci.* 2014. V. 19. P. 10–17.
249. 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.

250. Toledo-Ortiz G., Johansson H., Lee K.P., Bou-Torrent J., Stewart K., Steel G., Rodríguez-Concepción M., Halliday K.J. The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription // *PLoS Genet.* 2014. V. 10, № 6. Article e1004416.
251. Torres-Ruiz J.M., Diaz-Espejo A., Perez-Martin A., Hernandez-Santana V. Role of hydraulic and chemical signals in leaves, stems and roots in the stomatal behaviour of olive trees under water stress and recovery conditions // *Tree Physiol.* 2015. V. 35, №4. P. 415-424.
252. Trebacz K., Simonis W., Schönknecht G. Cytoplasmic Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , and NO^{3-} activities in the liverwort *Conocephalum conicum* L. at rest and during action potentials // *Plant Physiol.* 1994. V. 106. P. 1073–1084.
253. Trebacz K., Dziubińska H., Król 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.
254. Trebacz K., Sievers A. Action potentials evoked by light in traps of *Dionaea muscipula* Ellis // *Plant Cell Physiol.* 1998. V. 39. P. 369–372.
255. Tyree M.T., Yang S. Water-storage capacity of *Thuja*, *Tsuga* and *Acer* stems measured by dehydration isotherms : The contribution of capillary water and cavitation // *Planta.* 1990. V. 182, № 3. P. 420-426.
256. Vandeleur R.K., Sullivan W., Athman A., Jordans C., Gilliam M., Kaiser B.N., Tyerman S.D. Rapid shoot-to-root signalling regulates root hydraulic conductance via aquaporins // *Plant, Cell and Environment.* 2014. V. 37. P. 520–538.
257. Vass I., Styring S., Hundal T., Koivuniemi A., Aro E., Andersson B. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 1408–1412.
258. 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.
259. 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.
260. Volkov A.G. Green plants: electrochemical interfaces // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2000. V. 483. P. 150–156.

261. 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.
262. Volkov A.G., Collins D.J., Mwesigwa J. Plant electrophysiology: pentachlorophenol induces fast action potentials in soybean. Plant Science 2000. V. 153. P. 185–190.
263. 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.
264. Volkov A.G., Dunkley T.C., Morgan S.A., Ruff D., Boyce Y.L., Labady A.J. Bioelectrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems // Bioelectrochemistry. 2004. V. 63. P. 91–94.
265. 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.
266. Vredenberg W., Pavlovič 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.
267. Vredenberg W.J., Bulychev, A.A. Photoelectrochemical control of the balance between cyclic- and linear electron transport in photosystem I. Algorithm for P700⁺ induction kinetics // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1797. P. 1521–1532.
268. Wang P., Song C.P. Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid // New Phytol. 2008. V. 178. P. 703–718.
269. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance // Planta. 2003. V. 218. P. 1–14.
270. Wang W.X., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations // Acta Horticulturae. 2001. V. 560. P. 285–292.
271. Wang Y., Noguchi K., Ono N., Inoue S., Terashima I., Kinoshita T. Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014. V. 111. P. 533–538.
272. Westgate M.E., Boyer J.S. Transpiration- and growth-induced water potentials in maize // Plant Physiology. 1984. V. 74. P. 882–889.

273. Wilkinson S., Kudoyarova G.R., Veselov D.S., Arkhipova T.N., Davies W.J. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management // Journal of Experimental Botany. 2012. V. 63, № 9. P. 3499–3509.
274. Wortemann R., Herbette S., Barigah T.S., Fumanal B., Alia R., Ducousso A., Gomory D., Roeckel-Drevet P., Cochard H. Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe // Tree Physiol. 2011. V. 31, № 11. P. 1175-1182.
275. Xia X.J., Huang L.F., Zhou Y.H., Mao W.H., Shi K., Wu J.X., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in *Cucumis sativus* // Planta. 2009. V. 230. P. 1185–1196.
276. Xia X.J., Zhou Y.H., Ding J., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus* // New Phytol. 2011. V. 191. P. 706–720.
277. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress // The Plant Cell. 2002. V. 14. P. 165–183.
278. Zebelo S.A., Maffei E.M. Signal transduction in plant–insect interactions: from membrane potential variations to metabolomics./ In: Volkov AG, ed. Plant electrophysiology. Berlin: Springer-Verlag, 2012. pp. 33–63.
279. Zebelo S.A., Maffei M.E. Role of early signalling events in plant – insect interactions // Journal of Experimental Botany 2015. V. 66. P. 435–448.
280. Zhang R., Sharkey T.D. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress. Photosynth Res. 2009. V. 100. P. 29–43.
281. Zhang Z., Ramirez J., Reboutier D., Brault M., Trouverie J., Pennarun A.-M., Amiar Z., Biligui B., Galagovsky L., Rona J.-P. Brassinosteroids Regulate Plasma Membrane Anion Channels in Addition to Proton Pumps During Expansion of *Arabidopsis thaliana* Cells // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46, № 9. P. 1494–1504
282. 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.
283. Zhao D.J., Wang Z.Y., Huang L., Jia Y.P., Leng J.Q. Spatiotemporal mapping of variation potentials in leaves of *Helianthus annuus* L. seedlings in situ using multi-electrode array // Sci. Rep. 2014. V. 4. Article 5435.

284. Zhao L., Luo Q., Yang C., Han Y., Li W. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean // *Planta*. 2008. V. 227. P. 1389–1399.
285. Zhu J.K. Cell signaling under salt, water and cold stresses // *Current Opinion in Plant Biology* 2001. V. 4. P. 401–406.
286. Zimmermann M.H. Xylem structure and the ascent of sap. New York: Springer Verlag. 1983. pp. 283.
287. 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.
288. 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.