

На правах рукописи



Мудрилов Максим Андреевич

**Роль переменного потенциала в развитии специфического ответа
фотосинтеза при действии локальных раздражителей различной
природы**

1.5.2 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на базе кафедры биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент,
зав. кафедрой биофизики ИББМ
Воденеев Владимир Анатольевич

Официальные оппоненты: **-Иванов Борис Николаевич**
Доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории фотосинтетического электронного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт фундаментальных проблем биологии РАН»

- Трофимова Марина Сергеевна
Доктор биологических наук, заведующий лабораторией мембран растительных клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук»

Ведущая организация: - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится «22» сентября 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корпус 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2022/1287/diss-Mudrilov-1287.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Растения подвержены действию разнообразных неблагоприятных факторов окружающей среды. Адаптация к этим факторам включает в себя комплексные изменения физиологического состояния растения, согласованность которых происходит при участии дистанционных сигналов. Среди дистанционных сигналов особый интерес представляют электрические сигналы (ЭС), которые, как известно, способны индуцировать системные ответы, включающие в себя изменение активности фотосинтеза, транспирации, дыхания, экспрессии ряда генов и т.д. (Huber and Bauerle, 2016; Pavlovic, 2012; Sukhov et al., 2019). Такие системные ответы играют важную роль в адаптации растений к изменениям окружающей среды, однако неизвестно, насколько специфичны изменения, вызванные электрическими сигналами при действии различных стимулов. Имеются предпосылки возможности формирования такого стимул-специфичного системного ответа у растений. В частности, необходимо отметить наличие у растений трех типов ЭС, а именно: потенциала действия (ПД), стандартного импульса деполяризации; переменного потенциала (ВП), имеющего нерегулярную форму и продолжительность деполяризации; системного потенциала (СП), представляющего собой переходную гиперполяризацию (Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). Для ВП показано, что его амплитуда зависит от площади повреждения (Roblin, 1985) и интенсивности стимула (Stahlberg and Cosgrove, 1997a), а кроме того, есть свидетельства в пользу зависимости параметров ВП от типа стимула (Stankovic et al., 1997; Stankovic and Davies, 1996). Отдельные работы также демонстрируют возможность развития различающихся по параметрам системных ответов при действии различных локальных раздражителей (Fromm et al., 2013; Vian and Davies, 2006; Zandalinas et al., 2020a). Приведенные факты дают основание полагать, что электрические сигналы способны индуцировать специфичные системные ответы. Однако механизмы, обуславливающие различия в параметрах ЭС при действии различных раздражителей, как и механизмы индукции ЭС специфичных системных ответов, остаются неизученными. Это обуславливает высокую актуальность исследования особенностей ЭС и обеспечивающих их механизмов при действии различных локальных стимулов. Также актуальным является изучение специфичности функциональных ответов растения, как с точки зрения фундаментальных исследований, так и прикладных, для возможного применения полученных знаний для развития методов направленной адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Цели и задачи исследования

Целью работы является выявление роли переменного потенциала в индукции специфического системного ответа фотосинтеза при действии различных локальных стимулов. В связи с поставленной целью, решались следующие задачи:

1. Анализ особенностей параметров переменного потенциала, индуцированного различными локальными стимулами.
2. Анализ механизмов, обуславливающих особенности параметров переменного потенциала при действии различных локальных стимулов.
3. Анализ специфичности ответа фотосинтеза, индуцированного переменным потенциалом, при действии различных локальных стимулов.
4. Анализ механизмов, лежащих в основе развития стимул-специфического системного ответа.

Научная новизна

Выявлены характерные для быстро и медленно нарастающих стимулов особенности параметров переменного потенциала, а также выявлены механизмы, лежащие в основе данных различий. Впервые показана специфичность ответа фотосинтеза при действии быстро и медленно нарастающих стимулов, которая может быть связана с индуцированными электрическими сигналами сдвигами pH и содержания фитогормонов.

Научно-практическая значимость

Получены новые знания о специфичности параметров переменного потенциала при действии различных раздражителей, особенностях механизма генерации и распространения и участия переменного потенциала в формировании специфического системного ответа. Полученные знания расширяют и дополняют теоретические представления о формировании ответных реакций растений на действие внешних факторов и могут быть использованы для дальнейших изысканий в данной области. Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках специальных курсов для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

Параметры переменного потенциала обладают специфичностью в отношении индуцирующих его стимулов, проявляющейся в виде

выраженного декремента амплитуды и скорости ВП в случае быстро нарастающих стимулов и отсутствием такового в случае медленно нарастающих стимулов. Различия в параметрах ВП обусловлены, вероятно, различным вкладом гидравлической и химической компонент сигнала в индукцию ВП. Вызванные ВП изменения активности фотосинтеза в нераздраженных частях растения обладают характерными чертами при действии быстро и медленно нарастающих стимулов, что обусловлено особенностями связанных с ВП сдвигов pH и содержания гормонов.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами принимал участие в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надежностью использованных экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК.

Апробация

Основные результаты работы представлялись на международных и всероссийских мероприятиях: Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" (Пущино, 2020); Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Н.Новгород, 2018, 2019, 2020, 2021); Всероссийском с международным участием IX Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Объем составляет 131 страницу машинописного текста, иллюстрированного 28 рисунками, и содержит 3 таблицы. Список литературы включает 242 источника, в том числе 241 работа на английском языке.

Благодарности

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-34-90175) и правительства РФ (проект № 075-15-2019-1892).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 посвящена обзору литературы по следующим темам: рецепции растениями различных абиотических факторов, таких как холод, тепло, механическое воздействие и т.д., и индукции электрических сигналов; дистанционным электрическим сигналам в растениях; специфичности системных ответов, вызванных электрическими сигналами при действии разных стимулов.

В **главе 2** перечислены использованные в работе объекты исследования, оборудование и описаны методики исследования.

Растения пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) и гороха посевного (*Pisum sativum* L.) возраста 14-21-дней. Горох выращивали гидропонным способом на 50% среде Хогланда-Арнона. Пшеницу проращивали в течение 3-х дней в дистиллированной воде, после чего проростки пересаживали в горшки с песком. Растения выращивались в условиях климатической камеры KBW-240 Binder (Германия) при температуре 24°C. Продолжительность освещения составляла 16 ч в сутки.

Локальное раздражение наносили на кончик второго зрелого листа пшеницы и на третий взрослый лист гороха. Использовали три типа раздражителей: 1) ожог кончика листа (1 см) открытым пламенем в течение 3 с; 2) постепенный нагрев кончика листа (1 см) до 60 °C в кювете с водой в течение 4-5 минут; 3) механическое повреждение кончика листа (1 см) путем сдавливания при помощи пластиковых цилиндров. Адаптация растений перед началом всех измерений осуществлялась в течение 1,5 ч.

Внеклеточную регистрацию электрической активности осуществляли с помощью Ag/AgCl-макроэлектродов ЭВЛ-1МЗ (ОАО «Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь), усилителем служил иономер ИПЛ-113

(ООО НПП «Семико», Россия), соединенный с компьютером. Контакт электродов с растением осуществлялся через хлопковые нити, смоченные в стандартном растворе следующего состава: KCl – 1 мМ, CaCl₂ – 0,5 мМ, NaCl – 0,1 мМ. Запись регистрируемой разницы потенциалов осуществляли с помощью программы «Param2». Расстояние от зоны повреждения до измерительных электродов Э1, Э2 и Э3 составляло 3, 6 и 9 см, соответственно. Электрод сравнения помещали рядом с корнями растения, в смоченный водой песок для пшеницы и омывающий корни стандартный раствор для гороха.

Ингибиторный анализ выполняли с использованием следующих ингибиторов: 1) Na₃VO₄ (2 мМ) – специфичного ингибитора H⁺-АТФаз плазматических мембран; 2) LaCl₃ (5 мМ) – блокатора Ca²⁺ каналов; 3) GdCl₃ (10мМ) – блокатора механочувствительных Ca²⁺ каналов; 4) N,N'-диметилтиомочевина (DMTU) (1 мМ) – скавенджера пероксида водорода (H₂O₂); 5) дифенилениодония (DPI) (20 мкМ) – специфичного ингибитора НАДФН- оксидазы. Вследствие плохого проникновения ингибиторов через эпидермис листа пшеницы эксперименты были выполнены на отсеченном листе. Лист отсекался примерно за 12 часов до загрузки. Отсеченный конец листа (второй взрослый лист пшеницы) погружали в раствор с ингибиторами и осуществляли загрузку ингибитора в лист под вакуумом, в течение 5 минут. В контрольный лист аналогичным образом загружали стандартный раствор. На растениях гороха ингибитор наносился локально на участке стебля с удаленным эпидермисом. Загрузку ингибитором осуществляли за 1,5 часа до начала измерений.

Анализ параметров фотосинтеза и транспирации осуществлялся с использованием стандартной системы для исследования фотосинтеза (Heinz Walz GmbH, Германия), которая включала в себя РАМ-флуориметр Dual-РАМ-100, инфракрасный газоанализатор GFS-3000 и измерительную головку 3010-Dual gas-exchange. Регистрировали такие параметры газообмена, как скорость ассимиляции CO₂, интенсивность транспирации и устьичную проводимость (gS). В качестве параметров флуоресценции хлорофилла оценивали квантовый выход фотосистем I и II – Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и нефотохимического тушения – NPQ. На растениях пшеницы измерение проводили на втором взрослом листе на расстоянии 5 см от области стимула, на кончик которого наносили раздражения, на растениях гороха – на нижележащем от раздражаемого листе. Исследуемый участок помещался в измерительной головке газоанализатора (~1,5×1,5 см).

На пшенице для анализа параметров фотосинтетической активности и их пространственно-временной динамики измерения осуществлялись с

использованием РАМ-флуориметра Open FluorCam FC 800-O/1010. Растение располагали в измерительной области прибора, размер которой составлял ~20×20 см. В исследуемом листе выделяли 3 области интереса, первая область располагалась на расстоянии от 2 до 4 см от области нанесения стимула, вторая – от 5 до 7 см, третья – от 8 до 10 см.

Метод флуоресцентного имиджинга для регистрации изменений pH в апопласте листа пшеницы применялся с использованием установки для флуоресцентного имиджинга DVS-03 (ИПЛИТ РАН, Россия). Использовался pH чувствительный флуоресцентный зонд BCECF (Molecular Probes, США), который загружался во 2-й лист проростков пшеницы. Растения пшеницы располагали на специально изготовленных подставках из пластика, закрепляя второй взрослый лист на подставке. Возбуждение флуоресценции осуществляли на длине волны 488 нм. Регистрация флуоресценции осуществлялась с использованием интерференционного фильтра 530 нм. Частота получения кадров составляла 2 в минуту, время экспозиции – 0,75 с. Общее время записи составляло 45 минут.

Метод LC/MS/MS применяли для анализа фитогормонов на жидкостном хроматомасс-спектрометре LCMS-8040 (Shimadzu, Япония). Для анализа содержания фитогормонов использовали фрагмент второго взрослого листа пшеницы. Расчет содержания абсцизовой (АБК) и жасмоновой кислоты (ЖК) в контрольных (нераздражённых) и опытных растениях, проводили на основании калибровочных зависимостей, полученных с использованием аналитических стандартов: АБК (Olchemim, Чехия) и ЖК (Sigma-Aldrich, США).

Статистическую обработку осуществляли в программе Microsoft Excel и GraphPad Prism 6. Все измерения производили на отдельных растениях. В каждой серии экспериментов для каждого воздействия использовалось не менее 10 растений. При обработке рассчитывали средние значения, стандартные ошибки среднего и доверительный интервал. В результатах на рисунках представлены средние значения и стандартная ошибка среднего, а также типичные записи отдельных измерений. Распределение выборок является нормальным, для оценки использовался критерий согласия Пирсона. Достоверность различий в выборках проверяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Стьюдента, с использованием критериев Даннетта и Тьюки для множественного сравнения. Для корреляционного анализа использовался коэффициент корреляции Пирсона.

Параметры переменного потенциала, индуцированного различными локальными раздражителями

Первый этап работы был направлен на изучение параметров ВП в растениях при действии таких раздражителей как постепенный нагрев, ожог и механическое повреждение. Нанесение раздражителя вызвало генерацию распространяющегося электрического сигнала в виде ВП как в растениях пшеницы, так и гороха. Параметры ВП различались в зависимости от типа раздражителей. При действии всех типов стимулов амплитуды ВП (A_{VP}) на

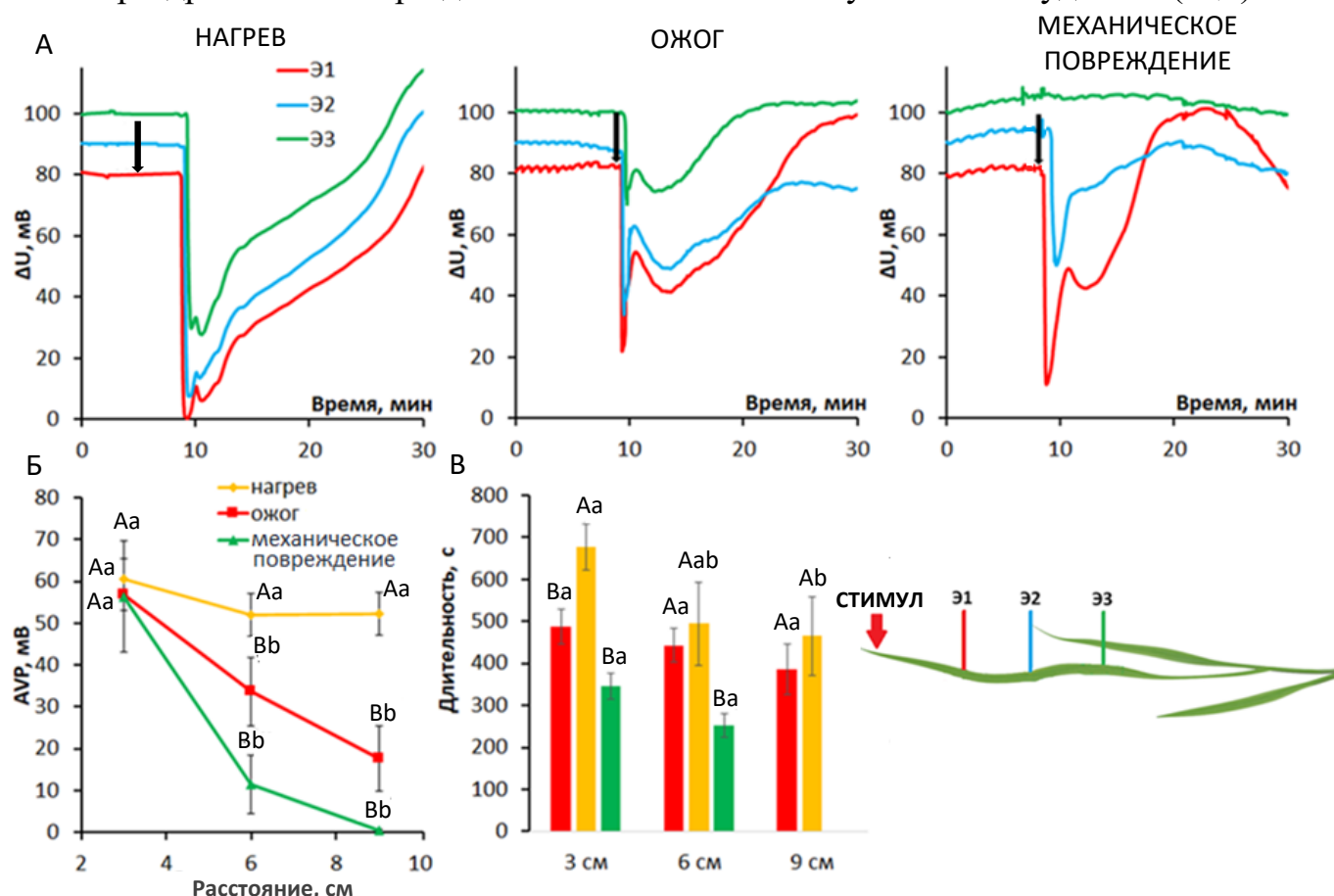


Рис. 1. А) Типичные записи индуцированного нагревом, ожогом и механическим повреждением ВП в проростках пшеницы. Стрелка показывает момент нанесения ожога, или механического повреждения, или начала нагрева (скорость нагрева ~ 6 °C/мин). Б) Зависимость амплитуды ВП от расстояния от зоны раздражения. В) Длительность ВП, индуцированного различными стимулами. Расстояние от зоны раздражения до Э1, Э2 и Э3 составляет 3, 6 и 9 см соответственно. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, строчные – на различных расстояниях в рамках одного стимула, $p < 0,05$.

растениях пшеницы в ближайшей к месту стимула точке регистрации (3 см) были примерно равны (рис. 1Б). Имеет место значительный декремент A_{VP} в случае ожога и механического повреждения. В случае нагрева декремент A_{VP} был незначительным. Длительность ВП (оцениваемую по времени возвращения потенциала на значения равные половине A_{VP}) в случае

механического повреждения была меньше, по сравнению с ожогом и нагревом (1В).

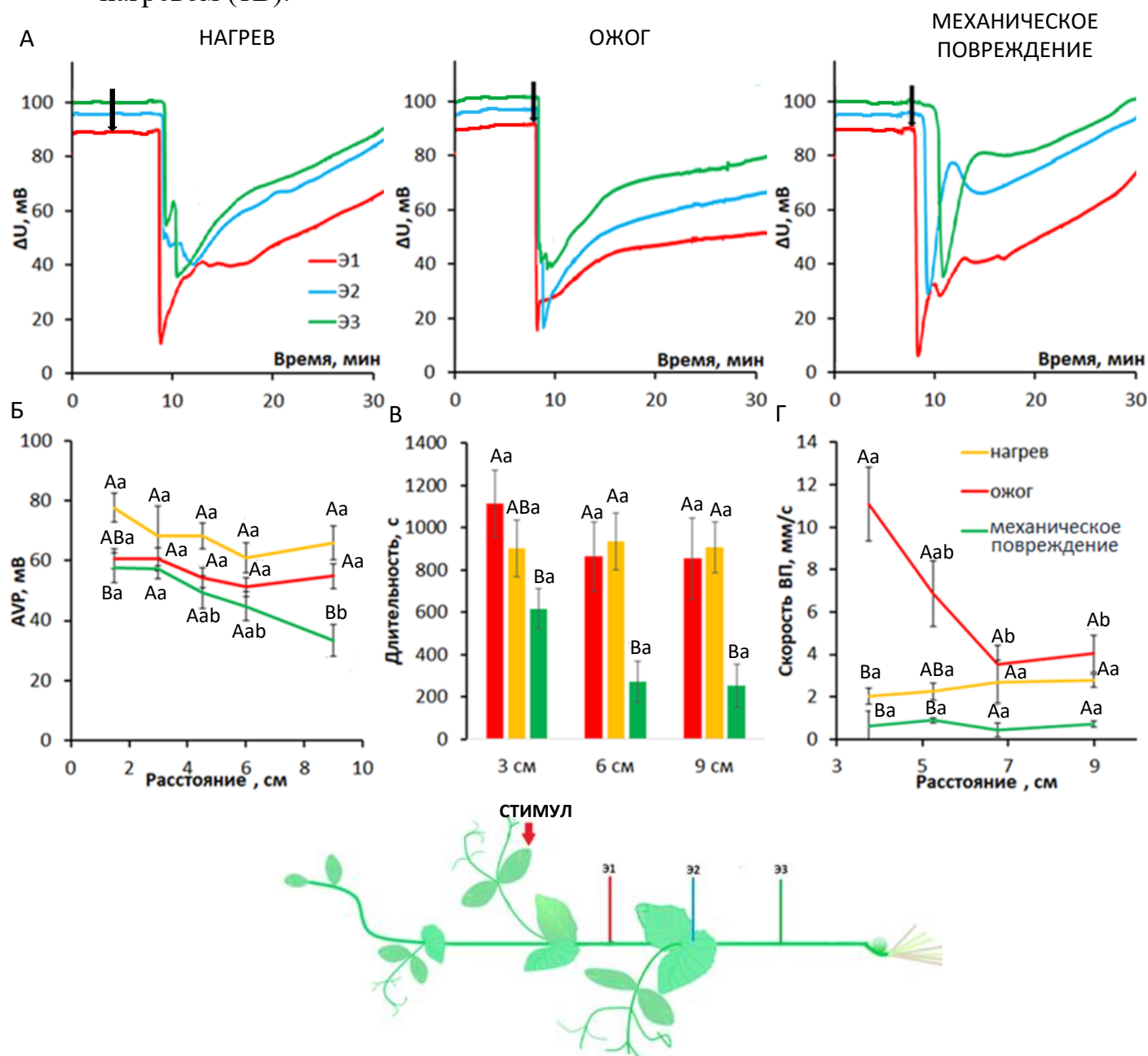


Рис. 2. А) Типичные записи индуцированного нагревом, ожогом и механическим раздражением ВП в проростках гороха. Стрелка показывает момент нанесения ожога, или механического повреждения, или начала нагрева (скорость нагрева $\sim 6^\circ\text{C}/\text{мин}$). Б) Зависимость амплитуды ВП от расстояния от зоны раздражения. В) Длительность ВП, индуцированного различными стимулами. Г) Зависимость скорости ВП от расстояния от зоны раздражения. Расстояние от зоны раздражения до Э1, Э2 и Э3 составляет 3, 6 и 9 см соответственно. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, строчные – на различных расстояниях в рамках одного стимула, $p < 0,05$.

Зарегистрированные параметры ВП в проростках гороха и пшеницы в целом соответствуют приведенными в литературе данным о параметрах

индуцированных различными стимулами ВП (Grams et al., 2009; Huber and Bauerle, 2016; Vian and Davies, 2006).

Проведенное исследование позволило выделить следующие характерные черты ВП, зависящие от типа стимула: 1) индуцированные ожогом и нагревом ВП имеют большую длительность в сравнении с механическим повреждением; 2) для нагрева характерен слабый декремент амплитуды и скорости ВП в сравнении с ожогом и механическим повреждением.

Ингибиторный анализ механизмов генерации и распространения переменного потенциала, индуцированного различными раздражителями

С целью выяснения механизмов, обуславливающих выявленные на первом этапе исследования различия в параметрах ВП при действии различных раздражителей, применили ингибиторный анализ с использованием специфичных блокаторов. Согласно современным представлениям, генерация ВП связана с Ca^{2+} -индуцированным снижением активности H^+ -АТФазы, при этом за вход Ca^{2+} могут отвечать механо- и лигандчувствительные каналы. В качестве лиганда могут выступать активные формы кислорода (АФК), такие как H_2O_2 , продуцируемые, в частности, НАДФН-оксидазами (Farmer et al., 2020; Fromm and Lautner, 2007; Huber and Bauerle, 2016; Sukhov et al., 2019). Вследствие плохого проникновения агентов, на пшенице эта серия экспериментов была выполнена на отсеченном втором листе проростков пшеницы, в который под вакуумом осуществлялась загрузка ингибитора. В качестве раздражителей использовали ожог и нагрев.

Ингибитор H^+ -АТФазы плазмалеммы Na_3VO_4 (Lew, 1991; Katicheva et al., 2014) вызывал практически полное подавление ВП как в случае нагрева, так и ожога. Полученные результаты указывают на, в целом, сопоставимый вклад H^+ -АТФазы плазмалеммы в генерацию ВП, индуцированного ожогом и постепенным нагревом.

Ингибитор Ca^{2+} -каналов La^{3+} (Hafke et al., 2013; Krol et al., 2006; Suda et al., 2020) приводил к снижению A_{VP} как при ожоге, так и при нагреве, до 60-80% от контроля. Это соответствует сведениям литературы, демонстрирующим ключевую роль Ca^{2+} в генерации ВП (Farmer et al., 2020; Huber and Bauerle, 2016; Klejchova et al., 2021; Sukhov et al., 2019), которая может заключаться в регуляции активности H^+ -АТФазы.

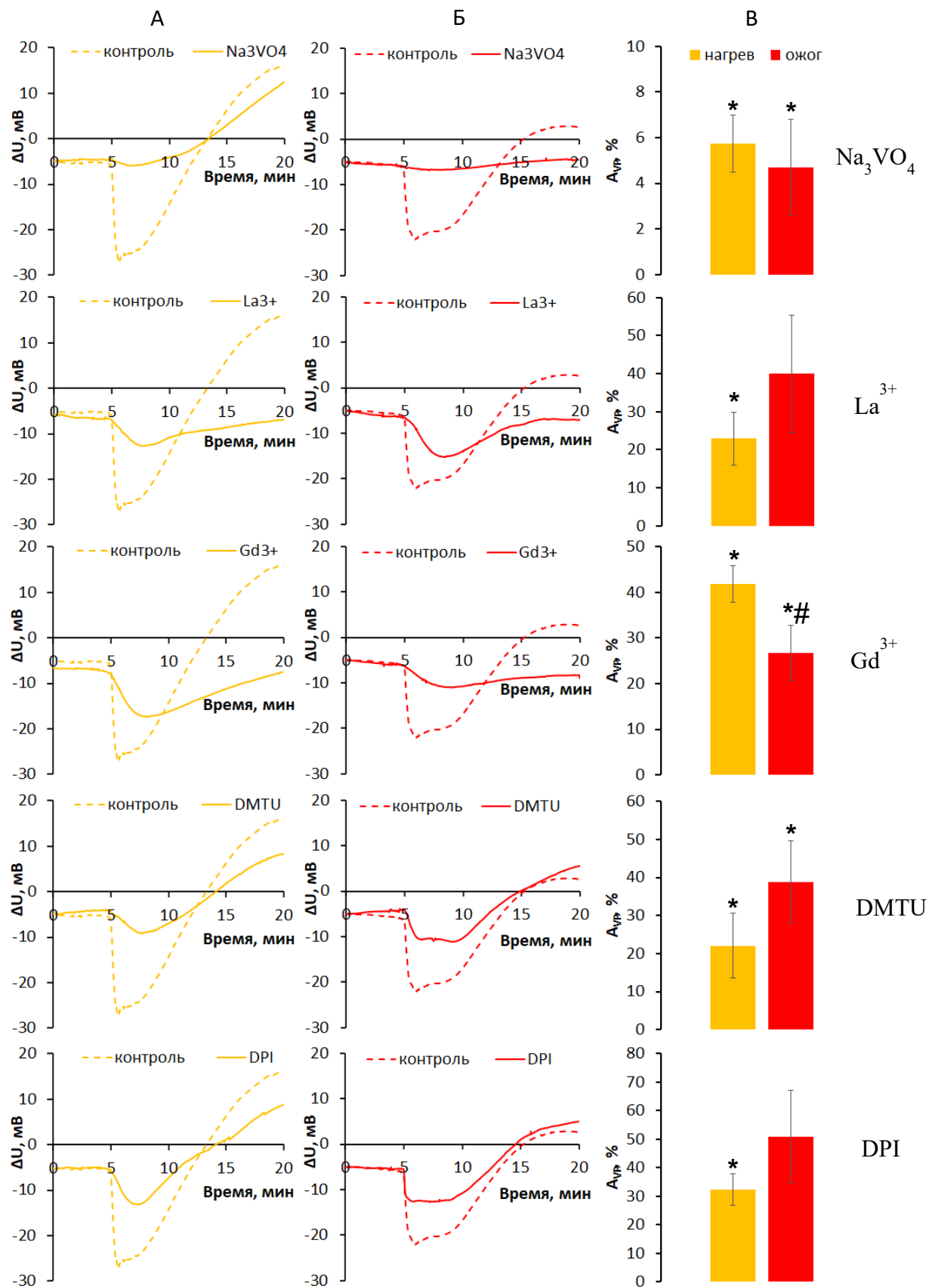


Рис 3. Влияние Na_3VO_4 (2 мМ), La^{3+} (5 мМ), Gd^{3+} (10 мМ), DMTU (10 мМ) и DPI (20 мкМ) на параметры ВП, индуцированного нагревом и ожогом. Усредненные записи ВП ($n=10$), индуцированного А) нагревом и Б) ожогом. Сплошная линия – в присутствии ингибитора, пунктирная – контроль. В) Влияние ингибитора на амплитуду ВП, индуцированного нагревом и ожогом. Амплитуда ВП выражена в процентах от контроля для соответствующего типа раздражителя. * - $p < 0,05$, отличия от контроля, # - $p < 0,05$, различия между стимулами.

Ингибитор механочувствительных Ca^{2+} -каналов Gd^{3+} оказывал большее влияние в случае ожога, вызывая снижение амплитуды ВП у пшеницы более чем на 70%, тогда как для нагрева снижение составляло около 55%. Полученные результаты указывают на большую роль механочувствительных Ca^{2+} -каналов в генерации ВП при ожоге, в сравнении с нагревом.

Диметилтиомочевина (DMTU), скевенджер H_2O_2 , вызывал значительное и достоверное снижение A_{VP} для обоих типов раздражителей, что может указывать на участие АФК в индукции ВП в случае как ожога, так и нагрева. Тем не менее, данные свидетельствуют о немного большем подавлении ВП (но без достижения статистически значимых различий), индуцированного нагревом, при сравнении с ожогом.

Ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодоний (DPI) приводил к статистически значимому снижению амплитуды ВП лишь в случае нагрева. Несмотря на то, что DPI является ингибитором всех ферментов с флавиновыми группами (O'Donnell et al., 1994), в совокупности с данными о более значительном подавлении индуцированного нагревом ВП под влиянием DMTU, это указывает на большую роль АФК, продуцируемых при участии НАДФН-оксидазы, в индукцию ВП в случае нагрева, в сравнении с ожогом.

Выявленные на проростках пшеницы различия в индуцированных нагревом и ожогом ВП были исследованы также на растениях гороха, при локальном нанесении ингибиторов на участок стебля со снятым эпидермисом. Gd^{3+} оказывал эффект лишь на амплитуду ВП, индуцированного ожогом, но не нагревом. Действие DPI приводит к достоверному снижению амплитуды ВП по сравнению с контролем лишь в случае нагрева.

Таким образом, можно полагать, что в случае ожога большую роль в индукции ВП играет гидравлическая волна, активирующая механочувствительные Ca^{2+} -каналы; в случае нагрева – распространение химического сигнала - АФК, продуцируемых при участии НАДФН-оксидазы.

Параметры индуцированного ВП ответа фотосинтеза при действии различных раздражителей

Следующим шагом стала оценка возможности развития стимул-специфичного системного ответа при действии различных раздражителей. В качестве системного ответа оценивались изменение активности транспирации и фотосинтеза, по таким параметрам как скорость ассимиляции CO_2 , квантовый выход фотосистемы I и II (Φ_{PSI} и Φ_{PSII}), а также нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ).

Распространение ВП в нераздраженный лист гороха вызывало снижение скорости ассимиляции в случае нагрева и ожога, при механическом повреждении ответ отсутствовал. Необходимо отметить тенденцию к большей амплитуде ответа ассимиляции в случае нагрева в сравнении с ожогом (рис. 4В). Изменение интенсивности транспирации представляет собой двухфазную реакцию, в виде небольшого начального роста с последующей второй фазой в виде резкого спада. В отличие от снижения ассимиляции, изменения транспирации наблюдалось при всех типах раздражителей, при этом максимальное значение амплитуды изменения транспирации фиксируется при ожоге.

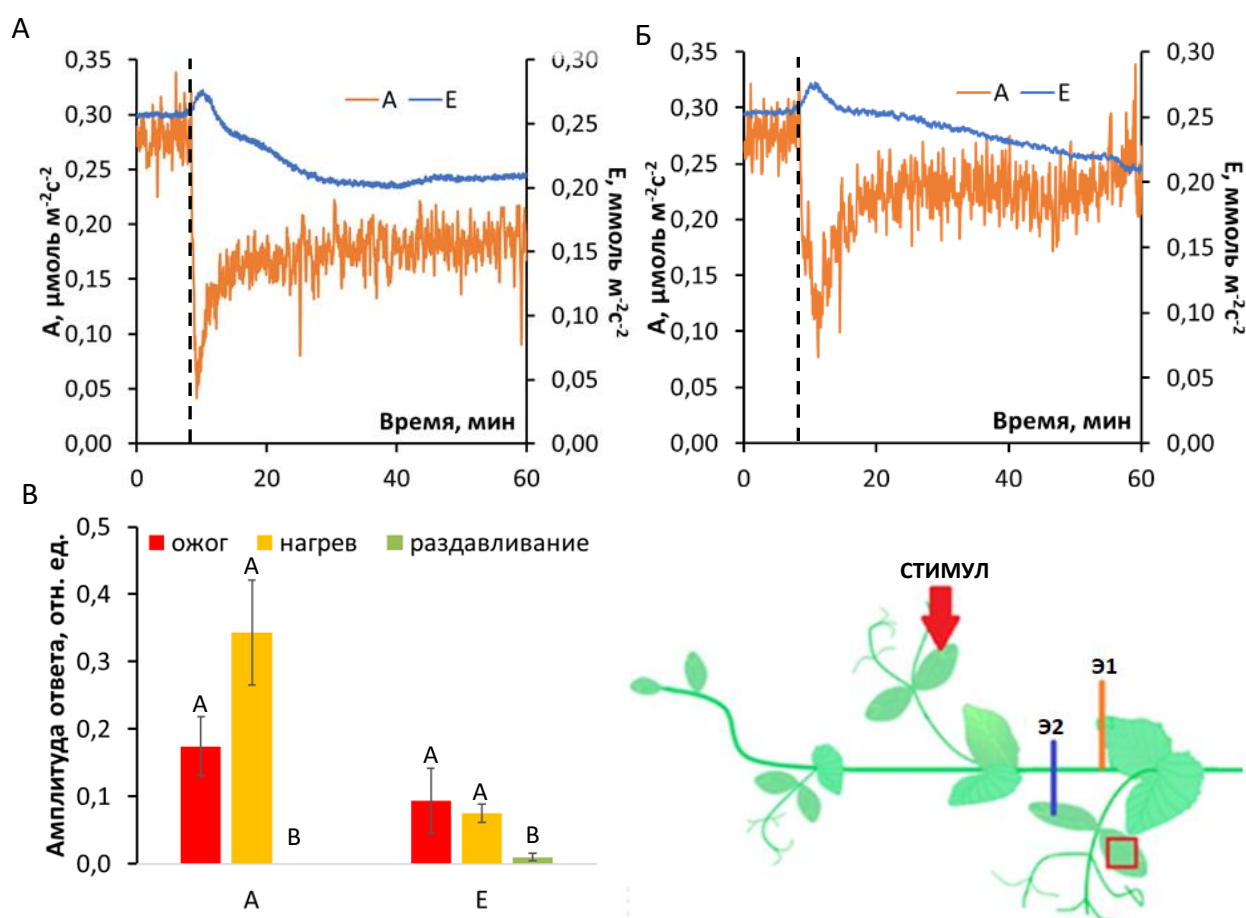


Рис. 4. А) Типичные записи индуцированных А) нагревом и Б) ожогом изменений скорости ассимиляции CO₂ (A) и интенсивности транспирации (E) в проростках гороха. В) Амплитуды изменений скорости ассимиляции CO₂ (A) и интенсивности транспирации (E), индуцированных действием различных раздражителей. Пунктир показывает момент возникновения ВП в листе. Красным обозначена область регистрации активности фотосинтеза. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, $p < 0,05$.

Также было изучено изменение показателей световой стадии фотосинтеза в нераздраженном листе, в виде снижения квантового выхода фотосистемы I (Φ_{PSI}), фотосистемы II (Φ_{PSII}) и повышение нефотохимического

тушения флуоресценции (NPQ) в ответ на локальный стимул. Такие изменения имели место в случае нагрева и ожога, но отсутствовали при механическом стимуле. Индуцированный распространением ВП ответ фотосинтеза имеет хорошо выраженную двухфазную динамику и результаты показали, что амплитуда изменений всех исследуемых показателей – Φ_{PSI} , Φ_{PSII} , NPQ – была выше в случае нагрева в сравнении с ожогом, в особенности, для второй фазы.

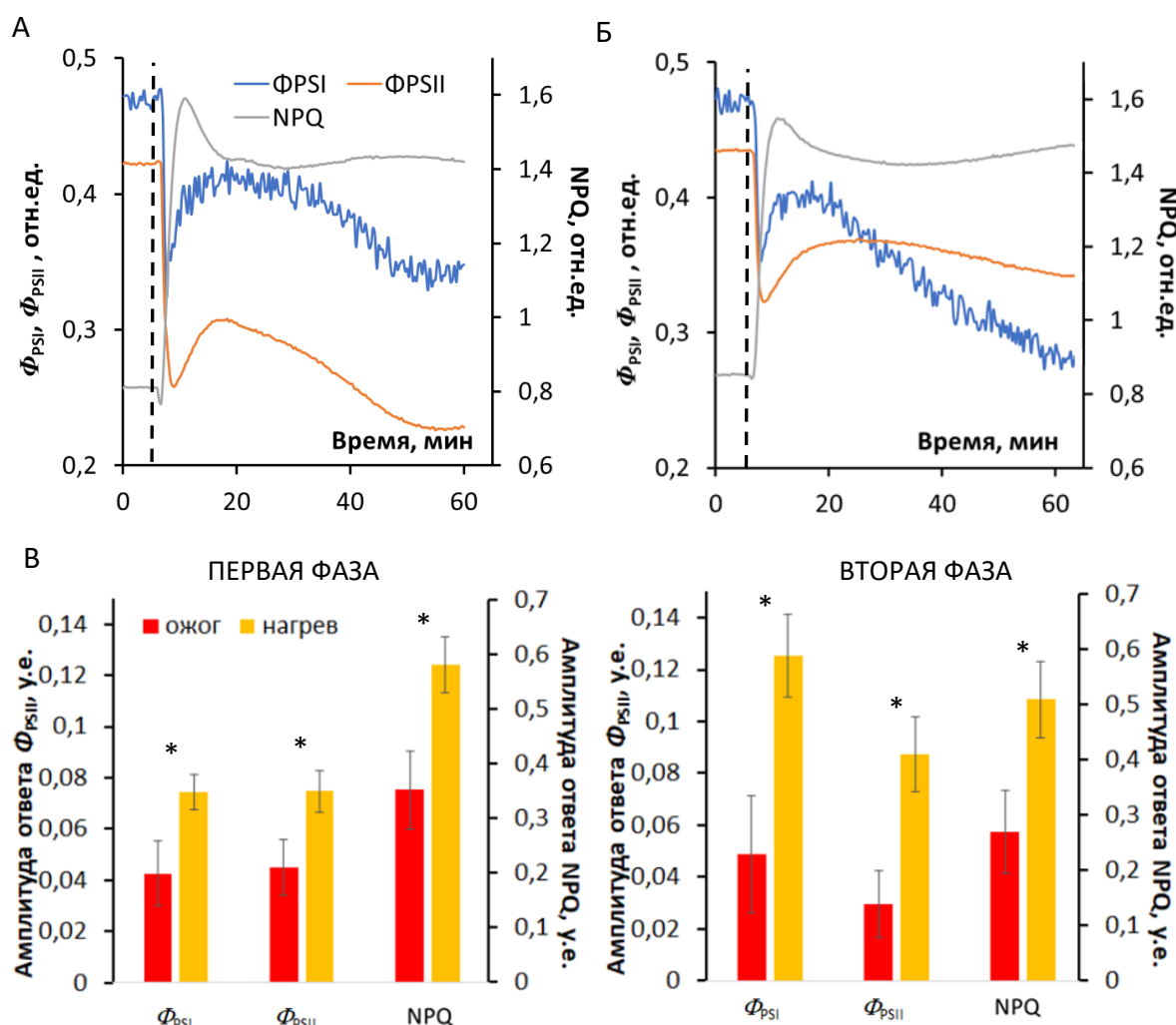


Рис.5. А) Типичные записи индуцированных А) нагревом и Б) ожогом изменений Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и NPQ. В) Амплитуды первой и второй фазы изменений Φ_{PSI} , Φ_{PSII} и NPQ в листе гороха, вызванных ожогом и нагревом. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в листе гороха. * - $p < 0,05$, различия между стимулами. Схема измерения приведена на рисунке 4.

На пшенице была изучена пространственно-временная динамика ответа фотосинтеза. С этой целью активность фотосинтеза регистрировали одновременно на различном расстоянии от зоны локального раздражения – на 3, 6 и 9 см от места нанесения стимула, соответственно. В качестве исследуемых параметров выступили амплитуды первой и второй фазы изменений Φ_{PSII} и NPQ. Амплитуды первой фазы изменений Φ_{PSII} (рис. 6А) и

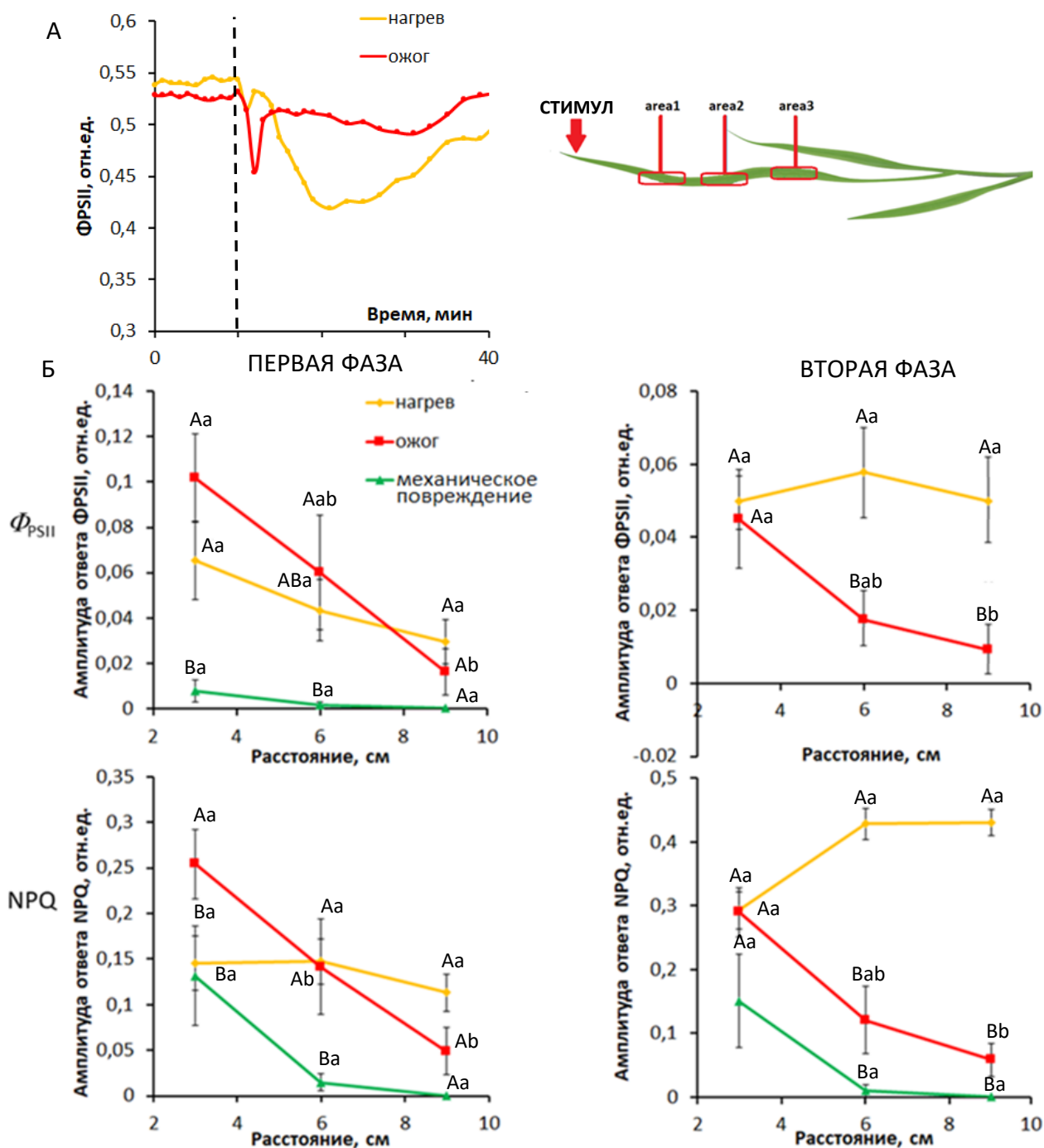


Рис. 6. А) Типичные записи индуцированных нагревом и ожогом изменений Φ_{PSII} . Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в area1. Б) Зависимость амплитуд первой и второй фазы изменений Φ_{PSII} ; амплитуд первой и второй фазы изменений NPQ от расстояния на листе пшеницы, индуцированные ожогом, нагревом и механическим повреждением. Красным обозначены области регистрации активности фотосинтеза. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, различные строчные буквы обозначают статистически значимые различия на различных расстояниях в рамках одного стимула, $p < 0,05$.

NPQ (рис. 6В) на небольшом расстоянии от зоны раздражения были выше для ожога, в сравнении с постепенным нагревом, однако, имелось сильное снижение амплитуды ответа с расстоянием, в отличие от нагрева, где спада амплитуды не наблюдалось. Также стоит отметить большую выраженность

второй фазы ответа Φ_{PSII} при нагреве. При механическом повреждении выраженный ответ фиксировался лишь на участке в 3 см от зоны раздражения, причем его амплитуда была наименьшей среди стимулов.

Полученные результаты позволили выявить ряд особенностей системного ответа при действии различных локальных раздражителей. Так, в случае ожога, вблизи места нанесения стимула наиболее выражена первая кратковременная фаза ответа фотосинтеза, в то время как в случае нагрева более выражена вторая продолжительная фаза ответа, амплитуда которой не уменьшается с расстоянием. При механическом повреждении практически отсутствует вторая фаза ответа фотосинтеза, а амплитуда первой фазы быстро снижается с расстоянием. В литературе практически не освещалась индукция системного ответа при действии различных стимулов, за исключением единичных работ, касающихся экспрессии генов, продукции гормонов и транспирации (Fisahn et al., 2004; Suzuki et al., 2013; Zandalinas et al., 2020). Выяснение механизмов, обуславливающих различия ответов, требуют изучения особенностей их индукции при действии различных стимулов.

Анализ механизмов развития специфичного функционального ответа при действии раздражителей различной природы

С учетом выявленных ранее стимул-специфических особенностей дистанционных сигналов и ответов фотосинтеза был выполнен анализ механизмов, обуславливающих специфичность ответа. Согласно современным представлениям, индуцированное ВП снижение активности фотосинтеза может быть обусловлено изменениями концентрации Ca^{2+} и H^+ , имеющем место при генерации ВП. В частности, изменения pH вызывают снижение доступности CO_2 , нарушения работы систем световой стадии фотосинтеза и т.д. (Sukhov et al., 2019). Индуцированные ВП изменения активности фотосинтеза также могут быть связаны с изменениями содержания гормонов, таких как жасмоновая (ЖК) или абсцизовая кислота (АБК). Увеличение содержания ЖК и АБК вызывают закрытие устьиц, снижая поступление CO_2 в клетки (Hlavabkova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012).

Первым этапом стало сопоставление связанных с ВП изменений pH при действии таких стимулов как нагрев и ожог. Изменения pH регистрировали на различном расстоянии от зоны раздражения с использованием флуоресцентного pH-чувствительного зонда BCECF, загруженного в апопласт. Ожог и постепенный нагрев, нанесенные на кончик листа, вызывают переходное защелачивание апопласта в нераздраженных

частях листа пшеницы. Динамика изменений рН является двухфазной, при этом, в случае нагрева, первая, кратковременная стадия ответа практически не затухает при распространении, в отличие от ожога. Вблизи места повреждения амплитуды первой фазы изменений рН практически одинаковы, однако, в случае нагрева более выражена вторая, длительная фаза ответа. Выявленные особенности сдвигов рН в целом соответствуют характерным для типа стимула особенностям ВП и первой фазы ответа фотосинтеза (рис. 7).

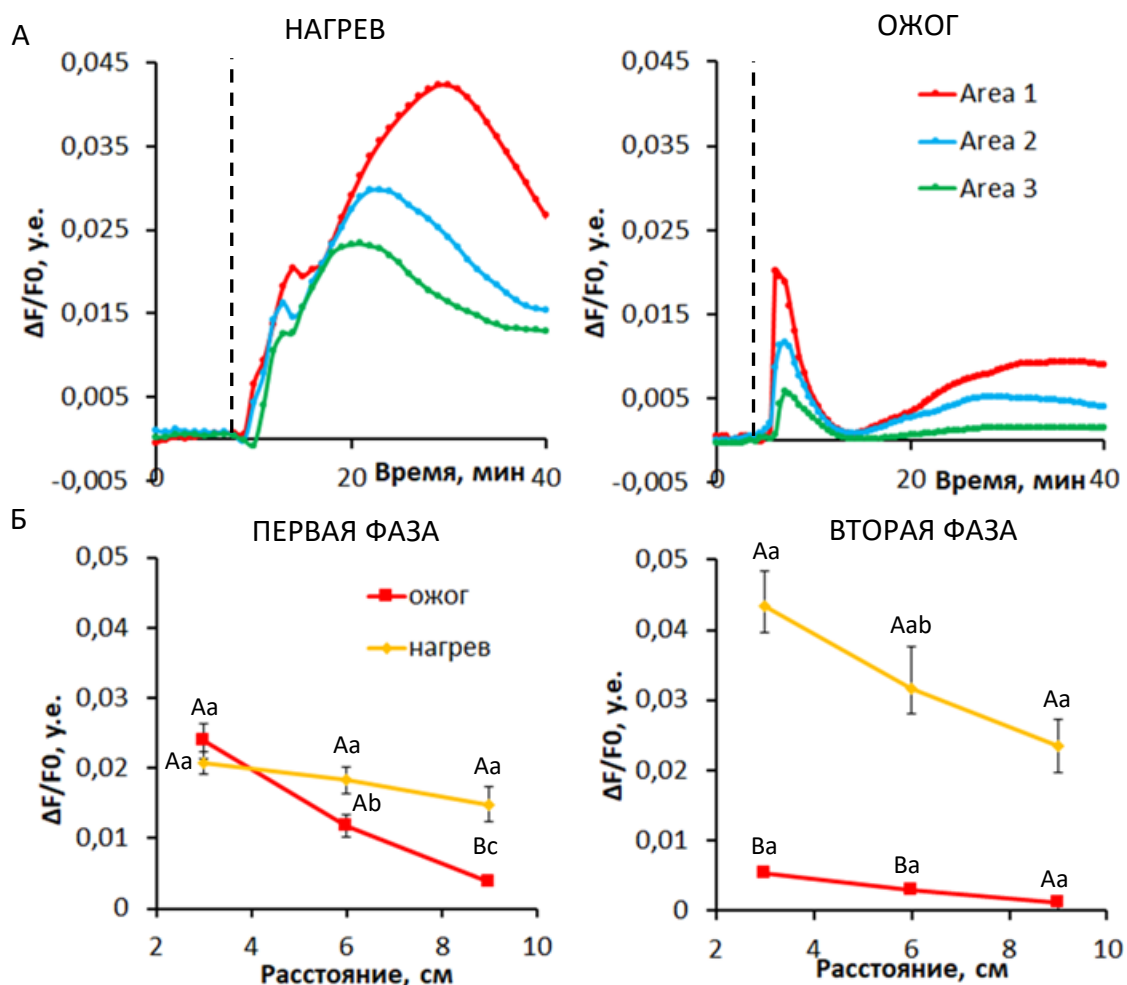


Рис. 7. А) Типичные записи изменений интенсивности флуоресценции рН-чувствительного зонда BCECF ($\Delta F/F_0$) в листьях пшеницы, индуцированных постепенным нагревом и ожогом. Рост значений соответствует защелачиванию апопласта. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в area1. Б) Зависимость амплитуд первой и второй фаз изменений $\Delta F/F_0$ от расстояния в листьях пшеницы, индуцированных ожогом и постепенным нагревом. Схема измерения приведена на рисунке 6. Различные прописные буквы обозначают статистически значимые различия между стимулами, различные строчные буквы обозначают статистически значимые различия на различных расстояниях в рамках одного стимула, $p < 0,05$.

Быстрые изменения рН связаны с изменением активности H^+ -АТФаз, которые участвуют в формировании ВП (Grams et al., 2009; Vodeneev et al., 2015), что было показано ранее результатами ингибиторного анализа. Стоит

отметить, что была зафиксирована корреляция (коэффициенты корреляции примерно 0,64 для нагрева и 0,78 для ожога) амплитуд первой фазы световой стадии ответа фотосинтеза и амплитуды ВП. Инактивация H^+ -АТФазы и обусловленный этим входящий поток H^+ ведут к защелачиванию апопласта и закислению цитозоля и, возможно, хлоропластов (Bulychev and Komarova 2014; Grams et al., 2009; Sherstneva et al., 2015; Sukhov et al., 2014; Szechynska-Hebda et al., 2017), что вызывает снижение активности фотосинтеза редукцией потока CO_2 , повышением NPQ и т.д. (Sukhov et al., 2019; Szechynska-Hebda et al., 2017). Для второй, долговременной фазы ответа фотосинтеза, корреляция с амплитудами ВП была меньше.

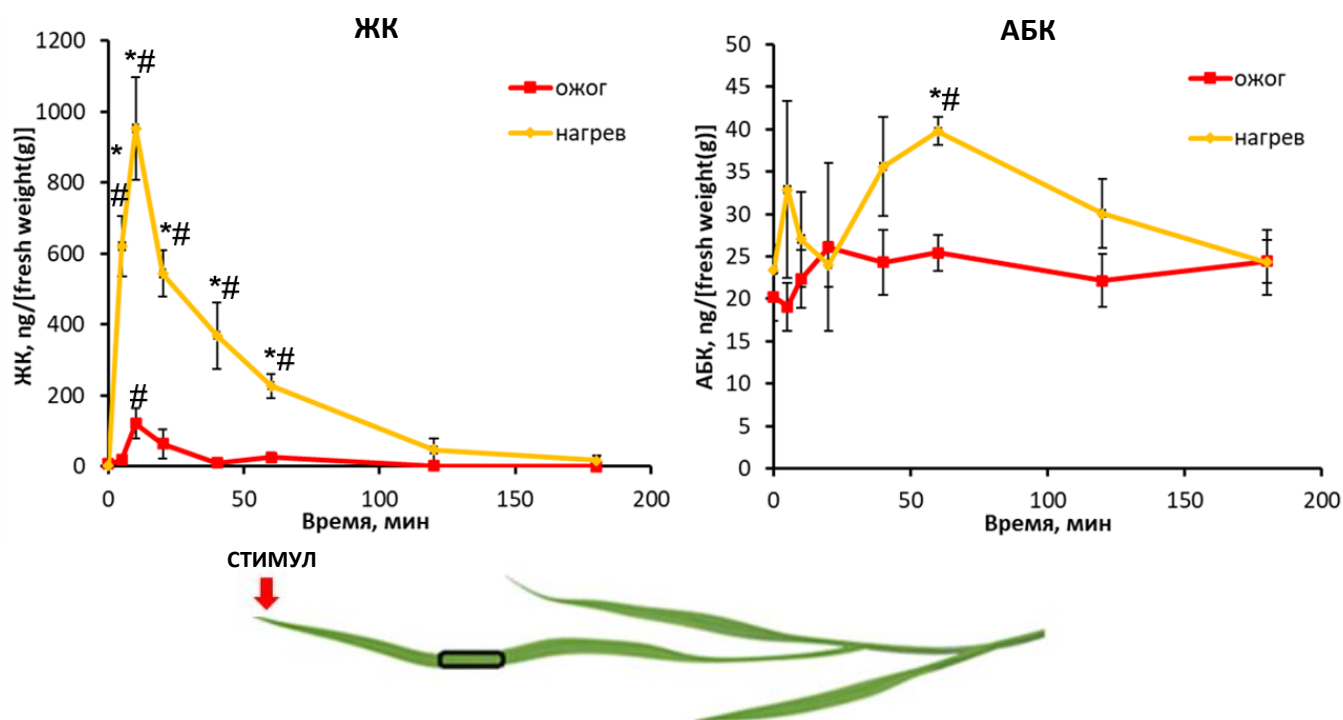


Рис. 8. Временная динамика изменений концентрации ЖК и АБК во втором листе пшеницы, индуцированных ожогом и постепенным нагревом. Черным обозначена исследуемая область. * - $p < 0,05$ при сравнении между стимулами, # - $p < 0,05$, при сравнении с концентрацией до стимуляции.

Далее была исследована динамика содержания абсцизовой (АБК) и жасмоновой кислоты (ЖК) в листе пшеницы. В случае постепенного нагрева в нераздраженной части листа имеет место статистически значимое повышение содержания обоих гормонов, тогда как в случае ожога статистически значимые сдвиги концентраций наблюдаются лишь для ЖК, однако, только в одной временной точке – через 10 минут после нанесения стимула. Это совпадает с максимумом концентрации ЖК при нагреве, причем это значение выше, чем для ожога, более чем в 5 раз (рис. 8).

Особенности динамики изменений содержания гормонов позволяет предположить их роль в развитии долговременной фазы ответа фотосинтеза.

На роль индуктора долговременной фазы инактивации фотосинтеза у пшеницы претендует ЖК, в пользу чего свидетельствуют выраженный сдвиг в концентрации, хорошее соответствие временной динамики концентрации ЖК и временной динамики второй фазы ответа фотосинтеза, способность ЖК вызывать инактивацию фотосинтеза (Maslenkova et al., 1995; Nabity et al., 2013; Ророва et al., 1988) и данные о роли ЖК в индукции долговременных ответов фотосинтеза, полученные для других растений (Hlavabkova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012).

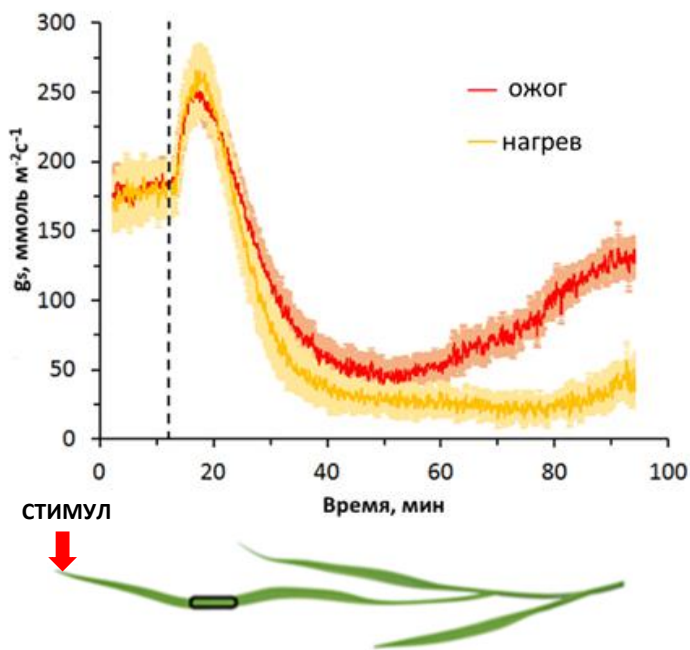


Рис. 9. Динамика устьичной проводимости (g_s) в проростках пшеницы, индуцированная ожогом и нагревом. Пунктиром обозначен момент возникновения ВП в исследуемой области.

Для проверки предположения о том, что в основе второй фазы ответа фотосинтеза может лежать вызванное гормонами снижение устьичной проводимости (g_s), на пшенице оценивали ее динамику, поскольку увеличение концентрации ЖК вызывает закрытие устьиц (Hlavackova et al., 2006; Hlavinka et al., 2012; Krausko et al., 2017). Изменения в устьичной проводимости имеют фазы роста и снижения (рис. 9), в случае нагрева подавление g_s более выражено и продолжительнее. Однако подъем g_s начинается сразу после распространения ВП и достигает максимума примерно через 5 мин. Последующее снижение g_s имеет намного большую длительность, при этом стоит отметить, что оно происходит после пика концентрации ЖК.

Таким образом, особенности ответа фотосинтеза могут быть объяснены изменениями pH и концентрации гормонов. За первую фазу ответа фотосинтеза, вероятно, отвечают индуцированные генерацией ВП изменения

pH, тогда как за вторую фазу ответа фотосинтеза отвечает рост концентрации ЖК, посредством снижения устьичной проводимости и доступа CO₂.

Заключение

К настоящему времени остается еще много нерешенных вопросов в области восприятия растениями внешних стимулов и формирования адаптивных реакций. Среди них особое место занимает проблема специфичности электрических сигналов и вызываемых ими системных ответов при действии локальных раздражителей.

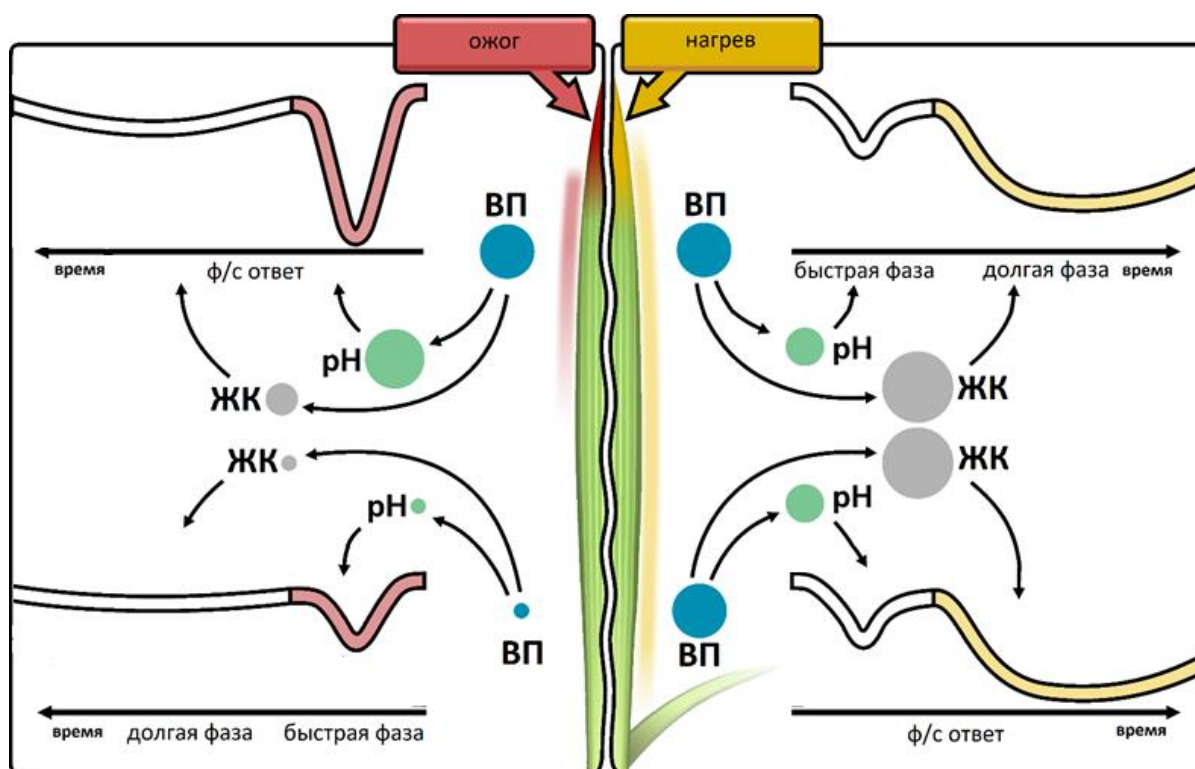


Рис. 10 Предполагаемая схема развития системного ответа фотосинтеза у проростков пшеницы, вызванного ожогом и нагревом. Локальный стимул вызывает генерацию распространяющегося ВП (синие кружки), который вызывает изменение pH (зеленые кружки) и содержания ЖК (серые кружки) в нераздраженных частях растения. В случае ожога большую роль в распространении ВП играет быстро затухающая гидравлическая волна, в то время как в случае нагрева – самоподдерживающаяся волна АФК. Это приводит к большей выраженности быстрой фазы ответа фотосинтеза при ожоге близи места повреждения, тогда как при нагреве более выражена долгая фаза ответа, не затухающая с расстоянием.

На основании анализа результатов, полученных в настоящей работе, а также данных литературы была предложена гипотетическая схема развития стимул-специфичного системного ответа (рис. 10). Локальный стимул индуцирует ВП, который быстро распространяется за пределы зоны раздражения. Быстро нарастающий стимул (ожог, механическое

повреждение) индуцируют ВП, для которого характерен значительный декремент, в отличие от медленно нарастающего стимула (постепенный нагрев), который индуцирует ВП, распространяющийся с относительно постоянной амплитудой и скоростью. Различия в параметрах ВП обусловлены, по-видимому, различным вкладом гидравлической волны и волны АФК, вызывающих активацию механо-чувствительных и АФК-зависимых Ca^{2+} -каналов, соответственно. Распространение ВП в нераздраженных частях растения вызывает изменения в рН и содержании ЖК. В свою очередь, сдвиги рН и ЖК соответственно индуцируют быструю и продолжительную фазы ответа фотосинтеза. В случае быстро нарастающего раздражителя ярко выражена быстрая фаза ответа, значительно затухающая с расстоянием. В случае медленно нарастающего стимула ярко выражена продолжительная фаза ответа, для которой не характерно выраженное затухание с расстоянием.

Выявленные различия в параметрах реакции, вероятно, важны для приспособления растения к быстро и медленно нарастающим раздражителям. В первом случае наибольшее значение имеет оперативная реакция вблизи зоны повреждения, для минимизации ущерба при повреждении, во втором - длительные изменения, обеспечивающие подготовку всего растения к возможным долговременным изменениям окружающей среды.

Выводы

1. Выявлены стимул-специфичные особенности индуцированного локальным ожогом, нагревом и механическим повреждением переменного потенциала (ВП) в растениях гороха и пшеницы. В случае быстро нарастающих стимулов (ожога и механического повреждения) имеет место выраженный декремент амплитуды и скорости ВП. В случае медленно нарастающего стимула (постепенный нагрев) ВП распространяется с относительно постоянной скоростью и амплитудой.
2. Блокирование механо-чувствительных Ca^{2+} -каналов в большей степени подавляет ВП, индуцированный ожогом, по сравнению с нагревом, а ингибирование НАДФН-оксидазы в большей степени подавляет ВП, индуцированный нагревом, в сравнении с ожогом. Это указывает на различный вклад гидравлического сигнала и волны АФК в индукцию ВП в случае ожога и нагрева.
3. Выявлены различия в параметрах индуцированного ВП ответа фотосинтеза при действии быстро нарастающего (ожог) и медленно нарастающего (нагрев) стимулов. В случае нагрева более выражена

продолжительная фаза ответа фотосинтеза, и имеет место меньшее затухание ответа с расстоянием в сравнении с ожогом.

4. Особенности индуцированных ВП изменений рН и содержания гормонов лежат в основе механизмов, обуславливающих специфичность системного ответа. Пространственная динамика изменений рН апопласта демонстрирует хорошее соответствие с таковой для параметров ВП и быстрой фазы ответа фотосинтеза. В случае нагрева имеет место больший в сравнении с ожогом сдвиг концентрации жасмоновой кислоты, который, вероятно, индуцирует длительные изменения фотосинтеза.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список журналов, рекомендованных ВАК:

1. Vodeneev V., **Mudrilov M.**, Akinchits E., Balalaeva I., Sukhov V. Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the nature of stimulus // Functional Plant Biology. 2018. V. 45(1-2). P. 160–170 (Q2, WoS)
2. Sukhova E., **Mudrilov M.**, Vodeneev V., Sukhov V. Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea // Photosynthesis Research. 2018. V. 136(2). P. 215–228 (Q1, WoS)
3. **Mudrilov M.**, Katicheva L., Ladeynova M., Balalaeva I., Sukhov V., Vodeneev V. Automatic determination of the parameters of electrical signals and functional responses of plants using the wavelet transformation method // Agriculture (Switzerland). 2020. V. 10(1). P. 7 (Q1, WoS)
4. **Mudrilov M.**, Ladeynova M., Berezina E., Grinberg M., Brilkina A., Sukhov V., Vodeneev, V. Mechanisms of specific systemic response in wheat plants under different locally acting heat stimuli // Journal of Plant Physiology. 2021. V. 258-259. P. 153377 (Q1, WoS)
5. **Mudrilov M.**, Ladeynova M., Grinberg M., Balalaeva I., Vodeneev V. Electrical Signaling of Plants under Abiotic Stressors: Transmission of Stimulus-Specific Information // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22(19). P. 10715 (Q1, WoS)

Тезисы:

6. **Мудрилов М.А.**, Воденеев В.А., Сурова Л. М. Роль варибельного потенциала в регуляции фотосинтетического ответа в листьях гороха при действии раздражителей различной природы // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 71-й Всероссийской с

- международным участием школы конференции молодых ученых. Н.Новгород, Университет Лобачевского. 2018. 266 с.
7. **Мудрилов М.А.**, Воденеев В.А., Юдина Л. М. Анализ особенностей генерации и распространения переменного потенциала в проростках гороха при воздействии раздражителей различной природы // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых ученых. Н.Новгород, Университет Лобачевского. 2019. 270 с.
 8. **Мудрилов М.А.**, Юдина Л. М., Воденеев В.А., Роль переменного потенциала в индукции специфического функционального ответа в проростках гороха при действии раздражителей различной природы // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»: тезисы докладов. 2019. 533 с.
 9. **Мудрилов М.А.**, Гришина А.И., Агеева М.Н., Гринберг М.А., Воденеев В.А. Роль переменного потенциала в развитии фотосинтетического ответа в растениях табака при действии раздражителей различной природы // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 2020, Пущино. Сборник тезисов. 2020. Издательство Синхробук (Synchrobook TM). 446 с.
 10. **Мудрилов М.А.**, Ладейнова М.М., Громова Е.Н., Воденеев В.А. Анализ особенностей электрического и фотосинтетического ответа в растениях пшеницы при действии раздражителей различной природы // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых ученых. Н.Новгород, Университет Лобачевского. 2020. 250 с.
 11. **Мудрилов М. А.**, Ветрова Я. А., Ладейнова М. М., Воденеев В. А. Характеристики переменного потенциала и ответа фотосинтеза и транспирации в растениях пшеницы при действии раздражителей различной природы // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых ученых, посвященной памяти проф. А.П. Веселова. Н.Новгород, Университет Лобачевского. 2021. 261 с.